

**Studien zur Interphasekernstruktur in Lymphozyten und anderen Geweben mit  
Hilfe der 3D-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung unter besonderer  
Berücksichtigung der X-Inaktivierung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Friederike Theresia Maria Hunstig  
geboren am 03. April 1983 in Salzkotten

#### Gutachter

1. PD Dr. Thomas Liehr, Jena
2. PD Dr. Irmgard Verdorfer, Innsbruck
3. Prof. Dr. Thomas Wendt, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.06.2010

Meiner Mutter

Das Studium des Baues und der Lebenserscheinungen der Zelle ist vielleicht mehr als irgend ein anderes geeignet, uns die Kläglichkeit unseres Wissens vor Augen zu führen.

Carl Rabl 1885

## Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
A. /Aqua dest.	destilliertes Wasser
ak	aktiv
AML	Akute Myeloische Leukämie
B, Brei	Breite
BAC	bacterial artificial chromosome
BCR	breakpoint cluster region
bzw.	beziehungsweise
C-Banding	Zentromer orientierte Chromosomenfärbung
c-abl	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene
CBC	Chromosomal Barcode
CCD-Kamera	Charge coupled device-Kamera
Chr.	Chromosom
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CSK-Buffer	Cytoskeletal Buffer
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxy-Adenosin-triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-triphosphat
DEAC	Diethylaminocumarin-5-dUTP
DFC	Dielectric Field Cage
dGTP	Desoxy-Guanosin-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOP	Degenerierter Oligonukleotid-Primer
DOP-PCR	PCR mit DOP-Primer
DS	Dextransulfat
dTTP	Desoxy-Thymidin-triphosphat
dUTP	Desoxy-Uridin-triphosphat
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
EGTA	Ethylen-glycol-tetra-essigsäure

FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G-Banding	Giensa-Bänderung
G1- / G2 –Phase	Gap-Phase im Zellzyklus
GTG	G-Bänderung Giemsa / Trypsin Bänderung
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
H2A	Histon 2A
H <sub>2</sub> O	Wasser
inak	inaktiv
IPM-FISH	Interspersed PCR-multiplex-FISH
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
KCl	Kaliumchlorid
L, Lä	Länge
LSM	Laser Scanning Mikroskop
macroH2A1.2	Subtyp von Histon H2A
MCB	Multicolor-Banding / Vierfarbenbänderung
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mMCB	multitude-Multicolor-Banding
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NOR	Nucleolus Organizing Region
o.g.	oben genannt(e)
p	den kurzen Arm des Chromosoms betreffend
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCP	Partial chromosome painting
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
peri(ph)	peripher
PHA	Phytohämagglutinin
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
q	den langen Arm des Chromosoms betreffend
Q-Banding	Quinakrin-basierende Bänderung
R-Banding	Reverse (G-)Bänderung
RISH	Radioaktive in situ Hybridisierung

RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Kulturmedium)
RT	Raumtemperatur
Rx-FISH	cross-species color banding
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S-FISH	Suspensions-Fluoreszenz in situ Hybrisisierung
S-FISH-MCB	(MCB-S-FISH) Kombination aus S-FISH und MCB
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus
SG	SpectrumGreen-dUTP (Vysis®)
SO	SpectrumOrange-dUTP (Vysis®)
sog.	sogenannt(e)(r)
SR	SpectrumRed-dUTP (Vysis®)
SSC	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat
SSCT	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat mit Tween
SSCTM	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat mit Tween und Marvel
T-Banding	Telomer orientierte Bänderung
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Polymerase aus Thermophilus aquaticus
TR	TexasRed-12-dUTP (Molekular Probes®)
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
Tw	Tween Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat
U	Umdrehungen bzw. Units
vgl.	vergleiche
VRC	Vanadyl ribonucleoside complex
WCP	Whole Chromosome Painting
X	X-Chromosom
Xi	inaktives X-Chromosom
XIC	X Inactivation Center
XIST	X inactive specific transcript
XIST-RNA-FISH	FISH mit einer XIST-RNA-Sonde
YAC	yeast artificial chromosome
z. B.	zum Beispiel
zentr.	zentral

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
Inhaltsverzeichnis	8
Zusammenfassung	11
1. Einleitung	13
1.1 Die Zytologie	14
1.2 Untersuchung an Chromosomen – die Zytogenetik	14
1.2.1 Bänderungszytogenetik	15
1.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	16
1.3 Der Interphasekern	21
1.4 3D-FISH	24
1.5 X -Inaktivierung / die Lyon Hypothese	24
1.6 Weitere Anwendungsbereiche	25
1.7 Stand der Forschung - Resümee	27
1.8 Fragestellungen	28
2. Materialien und Methoden	29
2.1 Das Untersuchungsmaterial	29
2.1.1 Kultivierung und Präparation der Lymphozyten	29
2.1.2 Aufarbeitung der Spermienzellen	30
2.1.3 Aufarbeitung des Gehirngewebes	30
2.1.4 Aufarbeitung des Knochenmarks	30
2.2 Vorbereitung der FISH-Sonden	30
2.2.1 DNA-Sonden	30
2.2.1.1 Multicolor-banding Sonden	30
2.2.1.1.1 Markierungs-PCR	30
2.2.1.1.2 DNA-Fällung	32
2.2.1.2 BCR-ABL-Sonden	33
2.2.2. RNA-Sonden	33
2.2.2.1 Amplifizierung	33
2.2.2.2 Nick Translation mit Biotin-11-dUTP	33



2.3 Durchführung der FISH	34
2.3.1 konventionelle FISH	34
2.3.1.1 Vorbereitung der Zellen und Pepsinverdau	34
2.3.1.2 Denaturieren des Objektträgers	34
2.3.1.3 Prähybridisierung der Sonden	35
2.3.1.4 Hybridisierung, Detektion und Waschung	35
2.3.2 DNA-S-FISH	36
2.3.2.1 Vorbereitung der Zellen und Pepsinverdau	37
2.3.2.2 Denaturierung	37
2.3.2.3 Prähybridisierung der Sonden	37
2.3.2.4 Hybridisierung, Detektion und Waschung	37
2.3.3 kombinierte DNA / RNA-S-FISH	39
2.3.3.1 Vorbereitung der Zellen und Pepsinverdau	39
2.3.3.2 Denaturierung	40
2.3.3.3 Prähybridisierung der Sonden	40
2.3.3.4 Hybridisierung, Detektion und Waschung	40
2.4 optische und digitale Analyse	40
2.4.1 konventionelle FISH	40
2.4.2 S-FISH	40
2.4.3 Dielectric Field Cage Chip (DFC-Chip)	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Optimierung der S-FISH Methode und Kombination mit MCB	41
3.2 Studien zur X-Inaktivierung an Lymphozyten	43
3.2.1 Zweidimensionale Studien an MCB-gefärbten X-Chromosomen	43
3.2.2 Dreidimensionale Studien an MCB-gefärbten X-Chromosomen	44
3.2.3 Dreidimensionale Studien mit RNA-XIST-Sonde	47
3.3 S-FISH-MCB-Studien an Spermien	50
3.4 Weitere S-FISH-Studien an Knochenmark, zum BCR-ABL-Rearrangement und an Hirngewebe	55
3.4.1 S-FISH-MCB-Studien an Knochenmark	55
3.4.2 S-FISH-Studien mittels lokusspezifischer Sonden	55
3.4.3 S-FISH-MCB-Studien an Hirngewebe	56

4. Diskussion	58
4.1 Optimierung der S-FISH Methode und Kombination mit MCB	58
4. 2 Studien zur X-Inaktivierung an Lymphozyten	60
4.2.1 Zweidimensionale Studien an MCB-gefärbten X-Chromosomen	60
4.2.2 Dreidimensionale Studien an MCB-gefärbten X-Chromosomen	61
4.2.3 Dreidimensionale Studien mit RNA-XIST-Sonde	64
4.3 S-FISH-MCB-Studien an Spermien	66
4.4 Weitere S-FISH-Studien an Knochenmark, zum BCR-ABL-Rearrangement und an Hirngewebe	67
4.4.1 S-FISH-MCB-Studien an Knochenmark	67
4.4.2 S-FISH-Studien mittels lokusspezifischer Sonden	67
4.4.3 S-FISH-MCB-Studien an Hirngewebe	67
4.5 Schlussfolgerungen	69
5. Literatur	70
6. Anhang	79
Danksagungen	86
Lebenslauf	87
Publikationen	88
Ehrenwörtliche Erklärung	90

### Zusammenfassung:

Die Persistenz der Chromosomen in ihrer Struktur bis hin zu ihrer Bandenabfolge während der Interphase, darstellbar mittels eines Fluoreszenz in situ Hybridisierungs- (FISH) basierenden Bänderungsverfahrens, dem sog. Multicolor Banding (MCB), gilt als erwiesen. Auf der Basis eines in Jena entwickelten speziellen molekularzytogenetischen Verfahrens (sog. S-FISH-Technik) lag erstmalig eine Methode zur Analyse der Gesamtarchitektur der chromosomalen Strukturen am sphärischen, dreidimensional erhaltenen Interphasekern vor.

Die Lyon-Hypothese zur Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen bei Frauen gilt als erwiesen, die Rolle von Chromosomengröße und -position wird diskutiert.

Spermien, Knochenmark und Hirngewebe gelten als Gewebe, bei denen die (Interphase-) Kernarchitektur von großem Interesse und Bedeutung für die epigenetische Regulation der Genexpression ist.

### Ziele und Fragestellungen:

Insgesamt sollten durch die vorliegende Arbeit grundlegende Beiträge zur Interphasekernarchitektur menschlicher Zellen geliefert werden. Dies geschieht im Einzelnen durch:

1. Optimierung des S-FISH-Verfahrens und Verbindung der zwei bis dato noch nicht gemeinsam einsetzbaren Verfahren MCB und S-FISH.
2. Anwendung von MCB-S-FISH zur Klärung der tatsächlichen Lage und Struktur der menschlichen X-Chromosomen in peripheren Blutlymphozyten mit möglichen Rückschlüssen auf die X-Inaktivierung.
3. Anwendung von MCB-S-FISH für Pilotstudien zur Lage aller menschlichen Chromosomen in menschlichen Spermien.
4. Anwendung von S-FISH für Pilotstudien zur Lage des BCR-ABL Rearrangements in Lymphozyten sowie Beleg der prinzipiellen Anwendbarkeit der Methodik an Hirn- und Knochenmarkszellen.

### Methodik:

Angewendet wurden Grundverfahren der Molekularen Zytogenetik sowie neuere, zum Teil eigene Entwicklungen im Rahmen des MCB-S-FISH und einer kombinierten DNA/RNA-S-FISH.

### Ergebnisse, Diskussion und Schlussfolgerungen:

Orientiert an der Fragestellung wurden folgende Resultate erzielt:

1. Die S-FISH-Methodik kombiniert mit MCB sowie die kombinierte DNA/RNA-S-FISH konnten etabliert und optimiert werden für einen routinemäßigen Einsatz in der Forschung.
2. Lage und Struktur der menschlichen X-Chromsomen in peripheren Blutlymphozyten konnten an zwei- wie an dreidimensional erhaltenen Interphasekernen erfasst werden. Unterschiede in Größe und Ausdehnung der Chromosomenterritorien ließen sich nachweisen, welche in Übereinstimmung mit der Lyon-Hypothese stehen.
3. In der Frage der Interphasekernstruktur menschlicher Spermien konnten erstmalig umfassend diverse Parameter die chromosomale Lage im Kern betreffend untersucht und erfasst werden. Es zeigte sich dabei, dass sowohl die Größe als auch die Gendichte der Chromosomen diese Parameter mitbestimmten. Es ließen sich deutliche Analogien zu Lymphozyten und anderen Geweben herstellen.
4. Gewebe wie maligne Lymphozyten, Gehirn und Knochenmark konnten prinzipiell mittels MCB-S-FISH analysiert werden. Für die Zukunft bieten sich noch Weiterentwicklungen auf dem Gebiet des effizienteren Materialeinsatzes sowie der optischen und digitalen Weiterverarbeitung.

Zur grundlegenden Frage nach der Beschaffenheit der Interphasekernstruktur menschlicher Zellen konnten in dieser Arbeit wichtige Anhaltspunkte gewonnen werden. Es gelang die Bestätigung der Ideen, nach denen transkriptorisch aktive Chromosomen in Lymphozyten eher im Kernmittelpunkt vorzufinden sein sollen, sowie der Nachweis zweier „driving forces“ für die Anordnung von Chromosomen in der transkriptorisch inaktiven Interphase entsprechend Größe und Gendichte.

## 1. Einleitung:

Der Tatsache, dass wir heute eine fundierte Forschung an dreidimensional erhaltenen Zellkernen betreiben können, geht eine lange Geschichte medizinischer und naturwissenschaftlicher Entwicklungen voraus. Darunter befinden sich Erkenntnisse von derart außergewöhnlicher historischer Bedeutung wie Virchows Begründung der Zellulärpathologie, eines Begriffs von Pathologie, auf den ein Großteil des heutigen Verständnisses von Ätiologie, Diagnostik und letztendlich auch Therapie von Krankheiten zurückgeht. Die Beschreibung des Zellkerns als eigenständiges Organell durch Robert Brown zählt ebenso zu diesen Meilensteinen wie die erste Beschreibung der Chromosomen durch die deutschen Forscher Arnold und Flemming. Die Chromosomen als Struktureinheit bilden die Grundlage der modernen Zytogenetik, also der Chromosomenanalyse anhand von proteinvermittelten Bänderungsmustern, und deren Weiterentwicklung, der molekularen Zytogenetik. Bei letzterer ist das zentrale Verfahren die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), bei der fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden mit Chromosomenabschnitten in Metaphase- wie in Interphasekernen hybridisiert werden. Auf diesem in Forschung und Diagnostik seit Jahren etablierten Verfahren aufbauend konnte vor wenigen Jahren eine Methode abgeleitet werden, bei der eine suffiziente dreidimensionale FISH an sphärischen und damit nativ präparierten Interphasekernen möglich wurde (Suspension-FISH = S-FISH). Durch Kombination mit einem, zur DNA-vermittelten Chromosomenbänderung geeigneten, FISH-Bänderungsverfahren (Multicolor banding = MCB) wurde es prinzipiell möglich, Aussagen zur Lage menschlicher Chromosomen in unterschiedlichen Geweben, wie Lymphozyten, Spermien oder Knochenmark zu treffen.

Die vorliegende Arbeit hatte, neben der Etablierung einer derartigen Kombination von S-FISH und MCB, zum Ziel, erstmals die tatsächliche Lage und Struktur der menschlichen X-Chromosomen in peripheren Blutlymphozyten auch unter dem Aspekt der X-Inaktivierung zu bestimmen. Die erzielten Ergebnisse waren im Folgenden Grundlage für eine erstmalige Lagebestimmung aller menschlicher Chromosomen in menschlichen Spermien. Ebenfalls in ersten Ansätzen untersucht wurden Materialien aus Hirn- und Knochenmarksgewebe.

## 1.1 Die Zytologie

„Omnis cellula e cellula - Jede Zelle entsteht aus einer Zelle“ - Mit dieser Feststellung aus seiner Publikation „Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre“ (Virchow 1858) ist der Berliner Pathologe Rudolf Virchow als einer der frühesten Vertreter der modernen Zytologie zu betrachten. Basierend auf den ersten Theorien zur Organpathologie durch den Italiener Morgagni (Morgagni 1761) konstruierte Virchow ein vollkommen neues und bis heute in seinen Grundzügen gültiges Konzept medizinischer und naturwissenschaftlicher Forschung, in dem die Zelle und ihre pathologischen Veränderungen im Focus wissenschaftlicher Untersuchungen stehen.

Dabei erfolgte die „Entdeckung“ der Zelle lange vor Virchow durch den englischen Physiker Hooke, der als Erster den Aufbau von pflanzlichen Geweben wie dem Flaschenkork aus Kammern – „cellulae“ – beschrieb (Hooke 1665).

Der Zellkern, das Organell also, von dem wir heute wissen, dass darin die Erbinformation in Form von Desoxyribonukleinsäure – DNA – untergebracht ist, wurde durch den Schotten Robert Brown in einem Vortrag vor der Linnean Society of London mit dem Begriff „areola“ beschrieben (Brown 1810). Seine Funktion als „Zellbildner“ erkannte zuerst Schleiden, der auch den Nucleolus (Schleiden 1838) beschrieb. Die DNA selbst wurde in ihrer Doppelhelixstruktur bekanntermaßen 1953 von Watson und Crick erstmals beschrieben (Watson und Crick 1953), um ihre Rolle in der Vererbung weiß man seit Averys Untersuchungen mit Pneumokokken in den vierziger Jahren (Avery, et al. 1944).

## 1.2 Untersuchungen an Chromosomen – die Zytogenetik

Gegenstand der zytogenetischen Forschung, der klassischen wie der molekularen Zytogenetik, sind die Chromosomen. Entdeckt wurden diese Strukturen zuerst durch Arnold und Flemming (Arnold 1879); „getauft“ wurden sie jedoch den Anatomen Waldeyer (Waldeyer 1888), wobei der Begriff „Chromosom“ zunächst einen rein deskriptiven Charakter hatte, abgeleitet aus den griechischen Begriffen „chromos“ – Farbe und „soma“ – Körper.

Heute weiß man, basierend auf den Thesen von Sutton (Sutton 1904) und Boveri (siehe unten; durch diese beiden gelang auch erstmalig die Verknüpfung des bekannten Wissens über Chromosomen mit den Mendelschen Regeln (Mendel

1866)), dass die Chromosomen die Träger der Erbinformation sind. Es sind Einheiten aus DNA und entsprechenden Proteinen, die man überbegrifflich als Chromatin bezeichnet. Das Chromatin setzt sich etwa zu 20% aus DNA und zu 80% aus Proteinen zusammen, von denen neben Matrix- und Regulationsproteinen die basischen Histonenproteine einen wesentlichen Teil darstellen. Diese bilden mit dem DNA-Faden als sogenanntes Nucleosom eine kompakte Untereinheit der Chromosomen und dienen so der Kondensation der gesamten Zell-DNA, die unkomprimiert bei den etwa 3 Milliarden Basenpaaren des menschlichen Genoms theoretisch eine Länge von etwa 1m pro haploider Zelle hätte (Hirsch-Kaufmann und Schweiger 1996). Der erste Chromosomensatz wurde 1952 mit 48 Chromosomen pro Zelle angegeben (Hsu 1952), erst vier Jahre später wurde die korrekte Zahl 46 publiziert (Tijo und Levan 1956).

Bis zum Jahr 1970 wurde praktisch ausschließlich die klassische Zytogenetik angewandt, also eine pure Anfärbung der Chromosomen in einer Farbe. Die Chromosomen konnten nur anhand ihrer Größe und ihres Zentromerindexes charakterisiert werden. Dennoch erkannte man zwischen 1956 und 1970 bereits den Zusammenhang zwischen klinischen Syndromen und chromosomalen Aberrationen. Dazu zählen die Erstbeschreibung des Down-Syndroms bei Trisomie 21 (Lejeune et al. 1959), des Klinefelter-Syndroms bei überzähligem X-Chromosom beim Mann (Jacobs 1969) oder des Turner-Syndroms bei Fehlen eines X-Chromosoms bei Frauen (Ford et al. 1959). Als erstes Deletionssyndrom wurde das Cri-du-Chat-Syndrom beschrieben (Lejeune et al. 1964). Aus diesen Zusammenhängen konnte sich das Gebiet der Zytogenetik in der sicheren Diagnostik solcher Syndrome etablieren.

### 1.2.1 Bänderungszytogenetik

Die zytogenetische Forschung und Diagnostik basiert heutzutage auf der Analyse von groben numerischen Aberrationen sowie einer proteinvermittelten Bandenabfolge. Die bänderungszytogenetische Analyse erfolgt auf der Grundlage von Metaphasechromosomen die mittels eines speziellen, durch Lore Zech entwickelten, Verfahrens präpariert und anschließend gefärbt werden (Caspersson et al. 1968; Caspersson et al. 1970). Von wesentlicher Relevanz sind dabei eine Kultivierung der Zellen (Verma und Babu 1994), die Zugabe des Spindelgiftes

Colchizin (Ford und Hamerton 1956), das ein Arretieren des Zellzyklus in der Metaphase bewirkt, sowie eine Behandlung mit hypotoner KCl-Lösung, um ein Schwellen der Zellen zu bewirken (Hsu 1952). Wesentlich ist auch die Verwendung des sog. Fixatives, bestehend aus Methanol/ Eisessig, wie 2002 durch Claussen und Mitarbeiter gezeigt (Claussen et al. 2002). Mit der heute am meisten angewandten Färbetechnik, der GTG-Bänderung (Seabright 1971), können neben groben Aberrationen, wie Deletionen großer Chromosomenanteile oder ganzer Arme, auch Abweichungen im Bänderungsmuster nachgewiesen werden. Solche Abweichungen von der Norm, die weitestgehend spezifisch für jedes einzelne Chromosom sind, können durch grobstrukturell sichtbare Mutationen kleinerer Chromosomenabschnitte hervorgerufen werden. Sie sind bei manchen Fragestellungen für sich bereits aussagekräftig oder bieten einen ersten Anhalt für weitergehende Untersuchungen aus dem molekular-zytogenetischen oder molekulargenetischen Bereich. Neben der GTG-Technik, auch G-Banding genannt, die auf der nach Trypsinbehandlung unterschiedlichen Anfärbbarkeit der Chromosomenabschnitte mittels Giemsa - Färbung basiert, sind auch andere Techniken bekannt (Schreck und Distèche 2001). Darunter das älteste Bänderungsverfahren, das auf Quinakrin basierende Q-Banding (Caspersson et al. 1968; Caspersson et al. 1970), das heutzutage allerdings fast keine praktische Bedeutung mehr hat, das zum G-Banding reverse R-Banding (Dutrillaux und Lejeune 1971), das C-Banding, am Zentromer-nahen Heterochromatin orientiert (Arrighi und Hsu 1971; Sumner 1972), die NOR-Färbung, die an der Nucleolus Organizing Region ansetzt (Howell et al. 1975; Bloom und Goodpasture 1976) und das an den Telomeren ansetzende T-Banding (Viegas-Pequignot et al. 1983). Zusammengefasst finden sich die Chromosomen mit ihren Banden in einem weltweit gültigen Verzeichnis, dem International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (Shaffer et al. 2009).

### 1.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Obwohl die bänderungszytogenetischen Methoden eine sehr umfassende, da genomweite Übersicht liefern und international etabliert sind, haben diese Methoden auch klare Grenzen. Sie können lediglich anhand eines Schwarz-Weiß-Musters in Kombination mit der Chromosomenmorphologie grobe Abweichungen vom normalen Bänderungsmuster, Größenvariationen einer Bande oder eines ganzen Chromosoms oder aber Abweichungen des Zentromer-Indexes detektieren (Claussen et al. 2002).



Um einen differenzierten Einblick in die Struktur der Chromosomen in ihrem physiologischen Zustand aber auch bei pathologischen Veränderungen zu erhalten, ist heutzutage die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs (= FISH-)Technik notwendig. Es ist ein Verfahren, das auf der in situ (= im Gewebe stattfindenden) Hybridisierung fluoreszierender DNA-Sonden mit der chromosomalen DNA basiert. Daher spricht man auch von „molekularer Zytogenetik“ (Chang und Mark 1997). Die Vorteile dieser Verfahren gegenüber der Bänderungszytogenetik liegen auf der Hand. Es besteht die Möglichkeit, mit mehreren Farben, auch Falschfarben, zu arbeiten und damit detailliertere Informationen zu gewinnen. So können auch schwer unterscheidbare Chromosomen, wie die teilweise überaus stark kondensierten Chromosomen in Tumorzellen oder auch die akrozentrischen Chromosomen der Maus, sicher analysiert werden. Auch überschüssiges, nicht mittels G-banding identifizierbares, Chromosomenmaterial kann unter Umständen einem Ursprungschromosom zugeordnet werden (Liehr et al. 2006). Trotz alledem stellt die molekulare Zytogenetik eine Ergänzung, keinesfalls aber einen Ersatz klassischer zytogenetischer Verfahren dar. Im Vergleich zu rein molekularen Methoden bietet die molekulare Zytogenetik den einmaligen Vorteil, einzelne Zellen einer Analyse zugänglich zu machen.

Das Prinzip der FISH basiert, wie bereits angesprochen, auf dem Einbringen fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden auf das Chromosom. Die Grundlagen sind in Abbildung 1.1 schematisch aufgeführt. So verschieden die heute etablierten FISH-Verfahren auch sind (im Folgenden soll nur auf einige wenige eingegangen werden), so folgen sie doch alle dem gleichen Muster. Es werden speziell angefertigte DNA-Sonden erstellt, deren Sequenz analog zu den Chromosomenabschnitten ist, die von Interesse sind. Die Erstellung solcher Sonden erfolgt entweder durch den Molekulargenetiker, heutzutage meist als lokusspezifische BAC-Sonden (BAC = Bacterial artificial chromosome), oder durch den Zytogenetiker mittels chromosome flow sorting oder glasnadelbasierender Chromosomenmikrosezierung. Eine Sondenmarkierung kann entweder im Rahmen einer Polymerasekettenreaktion (Saiki et al. 1988) erfolgen oder aber durch die sog. Nick-Translation (Rigby et al. 1977). Dabei gibt es grundsätzlich die Möglichkeit, die Sonden direkt mit Fluoreszenzfarbstoff zu markieren oder aber indirekt mittels eines Haptens. Bei der indirekten Markierung werden zunächst Reportermoleküle oder Haptene wie Biotin oder Digoxigenin in die Sonde integriert. Diese müssen nach erfolgter Hybridisierung

noch mit entsprechenden fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern detektiert werden, um optisch sichtbar zu sein. Die Hybridisierungsreaktion erfolgt dann auf entsprechend präparierte (Pepsinbehandlung zur Eliminierung störender Proteinanteile; thermische oder chemische Denaturierung der DNA um die für die Hybridisierung benötigte Einsträngigkeit zu gewährleisten) Metaphasechromosomen oder Interphasekerne auf konventionellen Glasobjektträgern.

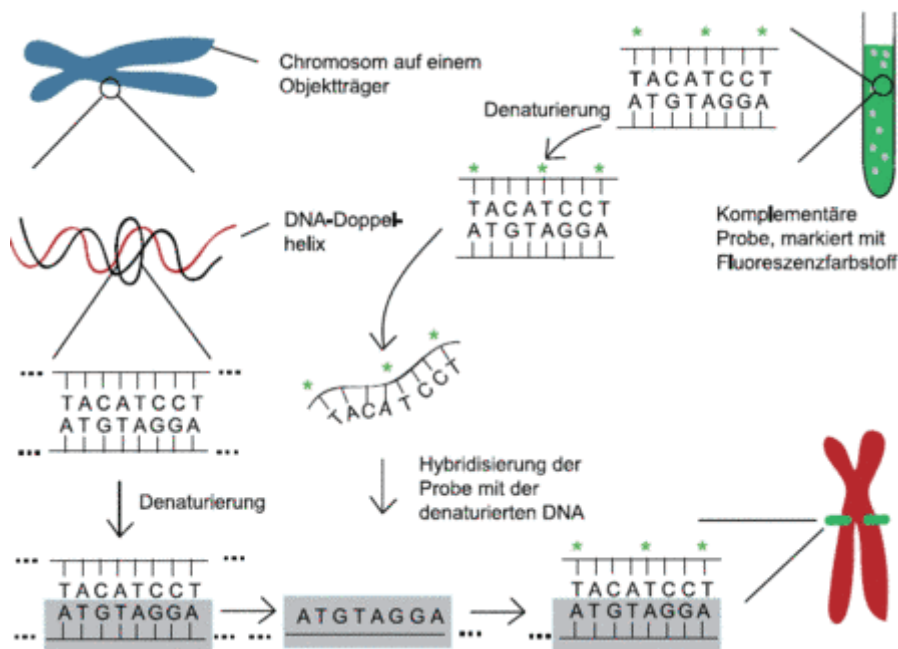


Abb.1.1. Das Prinzip der FISH (<http://www.medicinische-genetik.de/typo3temp/pics/c9dd25cae4.gif>)

Eine Kernfunktion, um das beschriebene Verfahren aber tatsächlich praktikabel zu machen, liegt im Prinzip der in-situ-Suppressionshybridisierung. Es ist bekannt, dass repetitive DNA-Sequenzen über das gesamte Genom verteilt vorliegen. Eine direkte Hybridisierung der FISH-Sonde auf das Chromosom ohne vorherige Suppressionshybridisierung würde ein theoretisch komplett unspezifisches Hybridisierungsmuster zur Folge haben. Die repetitiven Sequenzen innerhalb der Sonden könnten ungehindert an entsprechende Abschnitte auf dem Chromosom binden und so die spezifischen, gewünschten Reaktionen der Sonde mit der Ziel-DNA maskieren und die optische Auswertung der Hybridisierung unmöglich machen. Die Prähybridisierung beruht auf dem Wettbewerbsprinzip. Dies bedeutet, dass vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion mit dem Ziel-Chromosom der FISH-Sonde eine große Überschuss-Menge an unmarkierter genomischer Gesamt-DNA zugesetzt wird. Darauf folgt die Denaturierung. Der gewünschte Effekt besteht in einer Absättigung der repetitiven Sequenzen innerhalb der Sonde. Erst danach ist die Sonde präpariert für die eigentliche Hybridisierung am Chromosom.

Das Verfahren FISH entwickelte sich historisch gesehen aus der RISH, also der radioaktiven in-situ-Hybridisierung (Pardue und Gall 1969) und wurde 1986 zum ersten Mal in seiner heutigen Form beschrieben (Pinkel et al. 1986). Die eigentliche Überlegenheit der FISH zeigt sich aber vor allen Dingen im Bereich der Vielfarben-Verfahren. Bereits 1989 wurden erste Ansätze mit Drei-Farben-FISH publiziert (Nederlof et al. 1989). Eine weitere Vielfarben-FISH folgte, bei der ein Satz von 24 verschiedenen Ganzchromosomensonden verwendet wurde, um jedes der 24 unterschiedlichen menschlichen Chromosomen unterschiedlich anzufärben (Schröck et al. 1996; Speicher et al. 1996). Heutzutage existiert ein vielfältiges Repertoire an FISH-Färbemethoden, bei denen neben Ganz- und Teil- Chromosomensonden auch Zentromersonden, lokusspezifische Sonden und FISH-Bänderungsverfahren, die einen detaillierteren Einblick in die Struktur eines Chromosoms ermöglichen, immer weiter entwickelt werden. Bei Ganzchromosomensonden werden DNA-Sonden verwendet, die in Ihrer Sequenz einem bestimmten ganzen Chromosom entsprechen und dieses entsprechend komplett anfärben. Sie dienen in erster Linie dem Diagnostizieren von Translokationen und sind unter dem Begriff Whole Chromosome Painting (WCP) (Jalal et al. 1993) ein etabliertes Verfahren. Nach einem ähnlichen Prinzip funktionieren Partial Chromosome Painting (PCP) Sonden, die entsprechend größere oder kleinere Teilbereiche eines Chromosoms anfärben. Einfache intrachromosomale Veränderungen können damit unter Umständen detektiert werden. Zentromerspezifische Sonden (Lee et al. 1997) färben die im Zentromerbereich aller Chromosomen gehäuft vorkommende Alpha-Satelliten-DNA spezifisch an und können so zur Übersichts- und Aneuploidiediagnostik angewendet werden. Lokusspezifische Sonden, die nur kleinere Chromosomenabschnitte abdecken, eignen sich in konkreten Fragestellungen zur Diagnostik von kleinen Defekten, beispielsweise Mikrodeletionen oder Mikroduplikationen (Liehr et al. 1997). Die Vielfalt der FISH-Bänderungsmethoden lassen sich beschreiben als „Jede Art von FISH-Technik, bei der die Möglichkeit besteht, gleichzeitig mehrere chromosomale Unterregionen darzustellen, die kleiner als ein ganzer Chromosomen-Arm sind (Ausnahme: die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen). FISH-Bänderungsverfahren, die in diese Definition hereinpasse, mögen verschiedenste Eigenschaften aufweisen, sie alle teilen jedoch die Fähigkeit, DNA-spezifische Chromosomen-Bänderungen hervorzurufen.“ (Liehr et al. 2002a).

Eines der etabliertesten FISH-Bänderungsverfahren ist das Multicolor-Banding, kurz MCB (Chudoba et al. 1999). Das Prinzip besteht in der Anwendung von Regionen- (nicht Genlokus-) spezifischen Sonden, die mittels Mikrosezierung gewonnen und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Diese werden in standardisierten meist überlappenden Variationen so miteinander kombiniert, dass ein ganzes Chromosom abgedeckt wird und damit eine definierte Abfolge an farbigen Bändern zeigt. Durch die Überlappung unterschiedlicher Sonden besteht darüber hinaus die Möglichkeit, mittels eines Fluoreszenzintensitätsquotienten die Anteile der jeweiligen Farbstoffe zu berechnen, und in einem Falschfarbenmodus in einer noch höheren Auflösung, die in ihrer Präzision der Schwarz-Weiß GTG-Bänderung ebenbürtig ist (Lehrer et al. 2004), optisch darzustellen. Ansatzpunkt in der Forschung aber auch etablierten klinischen Diagnostik diese Verfahrens besteht im Bereich der Untersuchung komplexer intrachromosomaler Veränderungen (s. Abb. 1.2)

Neben dem chromosomenspezifischen MCB gibt es grundsätzlich auch die Möglichkeit, in entsprechend materialaufwändigen Ansätzen, das gesamte Genom mit Bänderungstechniken darzustellen. Dazu gehören IPM-FISH (Interspersed PCR-multiplex-FISH), das der GTG-Bänderung gleicht (Aurich-Costa et al. 2001), Cross-species color banding, kurz Rx-FISH, bei dem die Bänderung durch Hybridisierung von Ganzchromosomensonden des Gibbon auf menschliche Chromosomen entsteht (Müller et al. 1998), der Chromosomal Barcode (CBC), der mit somatischen Zell-Hybriden Mensch-Hamster arbeitet (Müller und Wienberg 2006) und schließlich multitude-Multicolor-Banding mMCB (Weise et al. 2003). Letzteres Verfahren ist eine Kombination aus den oben erwähnten MCB-Sonden für jedes einzelne Chromosom (s. Abb. 1.2).

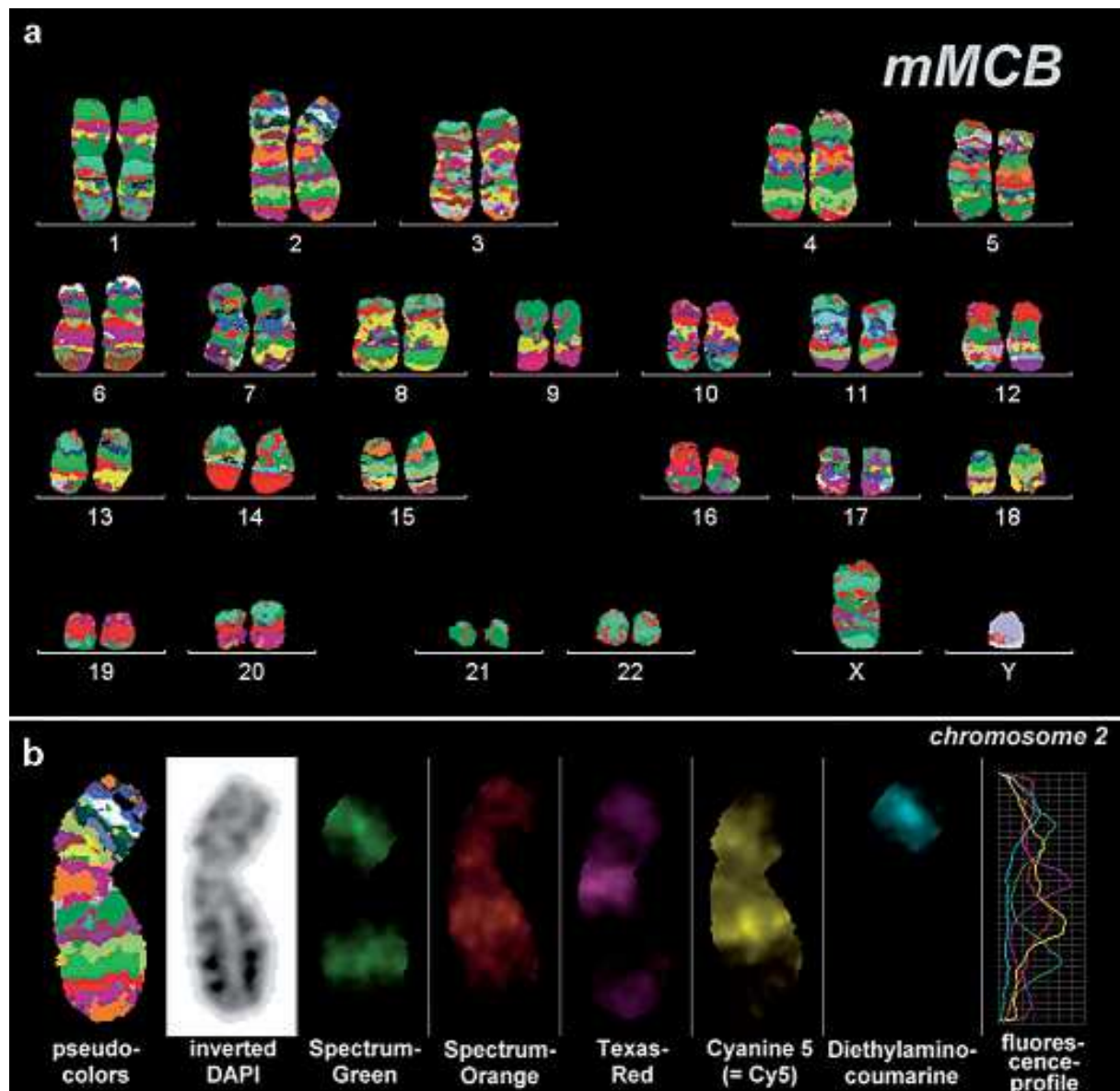


Abb. 1.2 Multicolor-Banding im Rahmen eines mMCB-Ansatzes. a) Chromosomen aus Knochenmark mit mMCB angefärbt und in Falschfarben dargestellt mit MetaSystems® (Isis) Software; b) spezifischer Blick auf das Chromosom 2 aus oben beschriebenem Ansatz. Man erkennt die Bänder in den einzelnen Farbstoffen, die Intensitätsunterschiede anhand des Fluoreszenzprofils, die daraus errechnete Falschfarbenbänderung und die Bänderung in der DAPI-Färbung, die einer angedeuteten GTG-Bänderung entspricht. (Liehr et al. 2006)

### 1.3 Der Interphasekern

Kurze medizingeschichtliche Erläuterungen zum Zellkern als Organell und seiner Erforschung sind in Kapitel 1.1 angerissen. Nachdem in den vergangenen Jahrzehnten die Analyse des menschlichen Genoms auf der Basis der Metaphase-Chromosomen Gegenstand intensiver Forschung war und mit den gängigen FISH-Analysen zu einem anerkannten Bestandteil molekularzytogenetischer Diagnostik geworden ist, widmet man sich erst seit kurzen wieder verstärkt der Analyse des Interphasekerns. Ein Beispiel für diagnostisches Interesse am nicht-dreidimensional

erhaltenen Interphasekern stellt die etablierte FISH-Schnelltesttechnik zur Untersuchung von Fruchtwasserzellen auf numerische Aberrationen des zweiten Schwangerschaftstrimenons dar. Dabei ist das Interesse an dem Interphasekern durchaus alt. So etablierten bereits Theodor Boveri und Karl Rabl erste Modelle zur Architektur des Interphasekernes. In seiner Publikation „Ueber Zelltheilung“ (Rabl 1885) in der sensationelle Beobachtungen an „Mutterknäuel“ und „Tochterknäuel“, also den Chromatinfiguren sich teilender Zellen geschildert und zum ersten Mal die Theorie von der Kontinuität der Chromosomen aufgestellt wird, beschreibt Rabl auch den ruhenden Zellkern. Bei der Beschreibung dieses Kernes, der also nicht gerade in einem Stadium der Teilung befindlich ist, werden zum ersten Mal „Chromosomenterritorien“ erwähnt. Später schildert Boveri in seiner Theorie über Chromosomenindividualität (Boveri 1909 ) einen ähnlichen Zusammenhang, mit der Ergänzung, dass eine Durchmischung der Chromosomen nicht nachweisbar sei. Hinweise zur Bestätigung dieser Theorie ergaben viel später UV-Mikrobestrahlungsexperimente. (Zorn et al. 1976; Zorn et al. 1979). Als dann erste FISH-Experimente mit WCP-Sonden unternommen wurden, bestätigten sich die Theorien zu den Chromosomenterritorien zunehmend (Manuelidis 1985; Schardin et al. 1985; Cremer et al. 1988; Lichter et al. 1988). Ferner konnte gezeigt werden, dass diese Territorien untereinander sich lediglich marginal zu überlappen scheinen (Visser und Aten 1999). Die Frage, wie die Chromosomenterritorien sich allerdings innerhalb eines Kernes tatsächlich verhalten, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Heute geht man grundsätzlich von einer radialen Anordnung um das Zentrum des Zellkernes aus (Warburton et al. 1973; Hens et al. 1982; Wollenberg et al. 1982). Hens et al. zeigten über diesen Zusammenhang hinaus, dass kleinere und früh replizierende Chromosomen tendenziell eher zentral im Kern lokalisiert sind (Hens et al. 1982). Diese Untersuchungen wurden allerdings an konventionell gespreiteten Metaphaseplatten angefertigt. Da das Verteilungsmuster aber unabhängig vom Individuum sowie diversen Faktoren wie Kultivierungszeit mit hoher Konstanz auftrat, ging man davon aus, dass sich das Ergebnis auch auf Interphasekerne übertragen lässt. Spätere Versuchsansätze an Interphasekernen von Fibroblasten, also von Natur aus flachen Zellkernen, und an Fruchtwasserzellen konnten diesen Zusammenhang zwischen Größe und Lage bestätigen (Sun et al. 2000; Weierich et al. 2003; Bolzer et al. 2005). Ferner wurde experimentell gezeigt, dass genärmere Chromosomen tendenziell eher in der Kernperipherie auftreten, während genreiche

Chromosomen innere Kernbereiche bevorzugen (Croft et al. 1999; Boyle et al. 2001; Cremer et al. 2001); eine Erkenntnis, die später auch für verschiedene Affenarten belegt werden konnte (Tanabe et al. 2005). Darüber hinaus konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass sich genreiche Chromosomen weniger kompakt als genärmere darstellen (Cremer et al. 2006). Den Zentromeren der einzelnen Chromosomen wird ferner bei der Bildung von sogenannten Prometaphaserosetten (Chaly und Brown 1988), in denen die Telomere außen, die Zentromere aber rosettenartig nach innen zeigen, eine Bedeutung zugemessen. Andere Arbeiten wiederum nennen im Gegenteil eine Anordnung, in der die Telomere zentral und die Zentromere peripher beschrieben werden (Weierich et al. 2003). Man geht davon aus, dass diese Anordnung eine organisierende Rolle im Rahmen des Zellzyklus darstellt, vor allen Dingen deshalb, weil diese Positionierung einer gewissen Dynamik zu unterliegen scheint (Haaf und Schmid 1991; He und Brinkley 1996), was Folgeversuche bestätigen (Scherthan et al. 1998). So zeigt sich die Rosettenformation während G1- und früher S-Phase noch nicht und die Zentromere weisen in die Zellkernperipherie, während sie in später S- und G2-Phase eindeutig zum Kernzentrum wandern (Solovei et al. 2004). Eine signifikante Systematik bei der Anordnung der Chromosomen zueinander im Sinne von Interaktionen miteinander wurde untersucht, konnte aber nicht mit abschließender Sicherheit belegt werden (Cornforth et al. 2002). Die Theorie der Homologenassoziation, bei der die zwei homologen Chromosomen nebeneinander liegen sollen, und die bei *Drosophila melanogaster* erwiesen ist (Hiraoka et al. 1993; Henikoff 1997), konnte beim Menschen nur für bestimmte Gewebe wie etwa neuronale Zellen (Arnoldus et al. 1989; Arnoldus et al. 1991), nicht aber für Blutlymphozyten verifiziert werden (Ferguson und Ward 1992; Vourc'h et al. 1993; Lesko et al. 1995).

Nachdem es nun also als belegt gilt, dass Chromosomen weitestgehend isoliert in ihren Territorien in der Interphase vorliegen, stellt sich aber die Frage, wie sie dabei in sich strukturiert sind. Eine Theorie beschreibt sie als völlig dekondensierten Chromatinfaden (Comings 1968). 2005 konnte allerdings in einem Ansatz mit MCB-FISH fürs Chromosom 5 gezeigt werden, dass das Bänderungsmuster konstant über die gesamte Interphase nachweisbar war. Die chromosomale Struktur zeigte sich also, wie in Abbildung 1.3 erkennbar, nicht aufgelöst, sondern vollständig erhalten (Lemke et al. 2002).

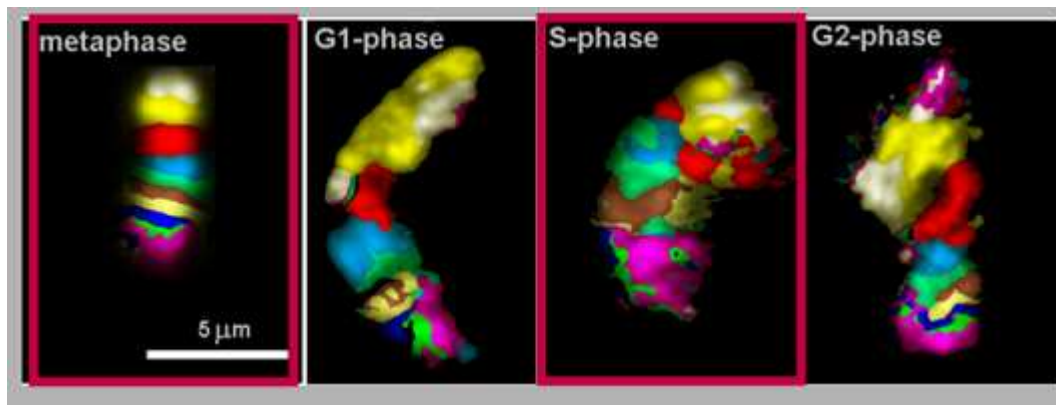


Abb. 1.3: Falschfarbenbänderungsmuster bei Chromosom 5 im Verlauf des Zellzyklus. Die Bänderung erweist sich als konstant nachweisbar (Lemke et al. 2002).

#### 1.4 3D-FISH

Um menschliche Blutlymphozyten und andere Gewebe mit runden Kernen verlässlich und ohne präparationsbedingte Schwellungsartefakte (Claussen et al. 2002) oder durch künstliches Verflachen beim Auftropfen auf den Objektträger entstandene Verschiebungen in ihrer Kernarchitektur analysieren zu können, bedurfte es einer völlig neuen Technik. 3D-FISH war bis dahin nur für Fibroblasten etabliert (Solovei et al. 2002), die jedoch bekanntermaßen sehr flache Kerne haben und damit weniger anfällig für o.g. Störungen sind. 2002 wurde darum von Ulf Steinhäuser mit Suspension-FISH (S-FISH) ein Verfahren erstmals publiziert, bei dem der gesamte Prozess der FISH mit in Suspension befindlichen Zellkernen durchgeführt wurde (Steinhäuser et al. 2002). Damit war ein Grundstein für moderne Interphasediagnostik an zahlreichen weiteren Gewebetypen gelegt.

Parallel dazu wurde in Berlin eine neuartige Chip-Technologie entwickelt, bei der auf der Basis eines wechselnden elektrischen Feldes dreidimensionale Partikel wie Zellen oder Kerne in definierten Winkeln gedreht und dreidimensional von mehreren Seiten mit entsprechendem Kameramaterial aufgenommen werden können (Reichle et al. 2001).

#### 1.5 X -Inaktivierung / die Lyon Hypothese

Als Beispiel für eine Fragestellung, die der Anwendung eines 3D-FISH-Verfahrens bedarf, ist die Untersuchung der X-Inaktivierung zu nennen. Es ist hinreichend bekannt, dass bei weiblichen Säugerorganismen, die in der Regel zwei X-Chromosomen aufweisen, ein Dosiskompensationsmechanismus nötig ist, um kein Ungleichgewicht im Vergleich zu männlichen Individuen auftreten zu lassen, der, mit geringfügigen Ausnahmen, beim Menschen die Ausschaltung eines ganzen X-



Chromosoms beinhaltet (Payer und Lee 2008). Bereits 1949 konnten Barr und Bertram das später als Barr-Körperchen bezeichnete Sex-Chromatin in den Neuronen weiblicher Katzen entdecken und als das überschüssige X-Chromosom identifizieren (Barr und Bertram 1949). Später dann stellte Mary Lyon ihre Theorie zur X-Inaktivierung auf (Lyon 1961): In weiblichen Zellen ist eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert. Dieses ist entweder mütterlicher oder väterlicher Herkunft. Die Inaktivierung erfolgt in der frühen Embryogenese. In den Tochterzellen wird immer das gleiche X-Chromosom inaktiviert, wie in der Zelle, von der diese abstammt. In den Zellen eines Individuums ist darum mosaikartig entweder das eine oder das andere inaktiviert (Hirsch-Kaufmann und Schweiger 1996). Dieser Prozess funktioniert ausgehend vom sogenannten XIST-Gen (X inactive specific transcript), lokalisiert am X Inactivation Center (XIC) (Borsani et al. 1991; Brockdorff et al. 1991; Brown et al. 1991). Dieses liegt grundsätzlich in beiden Chromosomen vor, transkribiert jedoch in der entscheidenden Phase um den 16. Tag der Embryonalentwicklung nur beim späteren inaktiven (Xi) Chromosom eine XIST-RNA (Johnston et al. 1998). Durch Anlagern dieser RNA an das Xi erfolgt eine Methylierung entsprechender Promotorregionen und damit eine Inaktivierung (Clemson et al. 1996). Ferner wird eine Akkumulation des modifizierten Histonproteins H2A, des Subtyps macroH2A1.2 (Costanzi und Pehrson 1998) beobachtet. Durch Veränderung der Histonproteine kommt es schließlich zur Kondensierung (Plath et al. 2003) und Bildung des Barr-Körperchens. Dieses grundsätzlich reversible, weil nicht in die DNA-Struktur eingreifende Phänomen wird in der Oogenese wieder aufgehoben (Payer und Lee 2008). Um die dreidimensionale Struktur der X-Chromosomen in der Interphase nachzuvollziehen, bietet sich ein S-FISH-Ansatz an. Bereits 1996 konnte ein Zusammenhang zwischen aktivem X und größerer, unregelmäßiger Oberfläche gefunden werden (Eils et al. 1996).

## 1.6 Weitere Anwendungsbereiche

Durch Etablierung und Verbesserung des S-FISH-Verfahrens (Liehr 2008) konnten Ansätze für die verschiedensten Fragestellungen gefunden werden:

Spermien: Die Kernarchitektur reifer Spermienzellen im Zweidimensionalen ist Gegenstand aktueller Forschung (Mudrak et al. 2005), eine Schleifenbildung der

Chromosomen wird diskutiert (Solov'eva et al. 2004). Regelrecht konfigurierte Spermien weisen lediglich einen haploiden Chromosomensatz auf. Gerade darum ist eine Analyse der Lage der Chromosomen zueinander, aber auch die Frage, ob ihre Position tendenziell eher zentral oder peripher zu finden ist, von großer Bedeutung, auch im Hinblick auf Vergleiche mit diploiden Zellen. Hilfreich ist hierbei die besondere Morphologie des Spermienkernes (Afzelius 1959). Eine Ausbuchtung im Bereich des Schwanzansatzes erlaubt es, den Kern nicht als komplett kugelförmig, sondern als eine achsensymmetrische, annähernd konische Figur zu betrachten. Erste Untersuchungen mit S-FISH verliefen erfolgreich (Manvelyan et al. 2008a; Manvelyan et al. 2008b)

Hirngewebe: Auch an entsprechend präpariertem Hirngewebe, das im Allgemeinen als nicht teilungsaktiv gilt, stehen Fragen zur Zellkernarchitektur zur Diskussion (Yurov et al. 2001).

Knochenmark/ BCR-ABL: Das Philadelphia-Chromosom, eine spezielle reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 (  $t(9;22)(q34;q11)$  ), mit Bruchpunkten im Onkogen *c-abl* (Chromosom 9) und der BCR-Region auf Chromosom 22 wird mit der chronisch myeloischen Leukämie assoziiert (Fitzgerald et al. 1963). Eine Überprüfung der Zellkernarchitektur in peripheren Zellen wie im Knochenmark ist ebenfalls von Interesse. Es konnte zuletzt in einem ähnlichen Kontext, bei Patienten mit AML, mit eben diesem S-FISH-Verfahren ein Zusammenhang zwischen der Konstellation der Chromosomen in der Interphase und der Erkrankung erkannt werden. (Manvelyan et al. 2009)

## 1.7 Stand der Forschung - Resümee

Die Persistenz der Chromosomen in ihrer Struktur bis hin zu ihrer intakten MCB-Bandenabfolge während der Interphase gilt als erwiesen. Angaben zur Gesamtarchitektur der chromosomalen Strukturen des Interphasekernes und konkrete Fragestellungen zu einzelnen Chromosomen konnten jedoch bisher nur in Ansätzen unternommen werden, die entweder die native Kernstruktur präparationsbedingt massiv angreifen oder aber sich an flachen Geweben wie Fibroblastenkernen orientieren. Auf der Basis des von Steinhaeuser 2002 in Jena entwickelten S-FISH-Verfahrens gab es erstmalig eine Methode, mithilfe derer konkrete Fragestellungen am sphärischen Interphasekern experimentell angegangen werden können. Ein zentraler Vorteil bestand darin, dass durch die Anwendung der MCB-Technik ein detailliertes Bild nicht nur ganzer Chromosomen sondern auch deren einzelner Abschnitte bis auf die Bandenebene ermöglicht wurde.

## 1.8 Fragestellungen

Ziele und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit waren:

1. Optimierung des S-FISH-Verfahrens und Verbindung der zwei bis dato noch nicht gemeinsam einsetzbaren Verfahren MCB und S-FISH.
2. Anwendung von MCB-S-FISH zur Klärung der tatsächlichen Lage und Struktur der menschlichen X-Chromosomen in peripheren Blutlymphozyten mit möglichen Rückschlüssen auf die X-Inaktivierung.
3. Anwendung von MCB-S-FISH für Pilotstudien zur Lage aller menschlichen Chromosomen in menschlichen Spermien.
4. Anwendung von S-FISH für Pilotstudien zur Lage des BCR-ABL Rearrangements in Lymphozyten sowie Beleg der prinzipiellen Anwendbarkeit der Methodik an Hirn- und Knochenmarkszellen.

Insgesamt sollten durch die vorliegende Arbeit grundlegende Beiträge zur Interphasekernarchitektur menschlicher Zellen geliefert werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Das Untersuchungsmaterial

Untersuchungsmaterial für die meisten Versuche der vorliegenden Arbeit stellten periphere Blutlymphozyten dar, die mittels peripherer Venenpunktion an einer gesunden weiblichen Probandin (Alter: 24 Jahre) gewonnen wurden.

Für die weiteren Versuche dienten Spermien eines gesunden, fertilen 30-jährigen männlichen Probanden, gespendet nach 3-tägiger sexueller Abstinenz, präpariertes Hirngewebe sowie präpariertes Knochenmark und präparierte Lymphozyten eines CML-Patienten.

Eine Zustimmung der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Jena für die durchgeführten Untersuchungen lag vor (Bearbeitungsnummer 1805-06/06).

#### 2.1.1 Kultivierung und Präparation der Lymphozyten

Verwendete Lösungen:

Aqua dest.

Grundsätzlich wurde organisch reines, mit Seralpur DELTA (Seral®) aufgearbeitetes und autoklaviertes Wasser verwendet.

Wachstumsmedium

Verwendet wurde RPMI 1640 Medium mit Glutamax-Zusatz. Darin enthalten: fetales Kälberserum (Biochrom KG) 12%, Streptomycin (Biochrom KG) 10.000U/ml und Penicillin (10.000µg/ml) sowie L-Alanin und L-Glutamin (GibcoBRL®).

Kaliumchlorid

KCl (Merck®) wurde in Aqua dest. zu einer 0,56%-igen KCl-Lösung gelöst und auf 4 °C heruntergekühlt.

Phytohämagglutinin

Lyophilisiertes Phytohämagglutinin (PHA, Seromed®) wurde in 5ml Aqua dest. (Ampuva®) gelöst.

Fixativ (Methanol-Eisessig)

Methanol (Merck®) und Eisessig (Merck®) wurden im Verhältnis 3:1 gemischt.

Die Kultivierung der Lymphozyten erfolgte nach dem etablierten Protokoll von Verma (Verma und Babu 1994). 1ml heparinisiertes Vollblut wurde mit 10ml RPMI 1640 und 0,1ml PHA-Lösung über 72 Stunden bei 37 °C in Kulturflaschen (Cellstar®) inkubiert.

Danach erfolgte die eigentliche Aufarbeitung. Hierbei wurde durch Aufschütteln der Flaschen zunächst eine Suspension unter Einbeziehung sämtlicher Zellen bewirkt. Es folgten die Überführung in 15ml-Spitzröhrchen-Falcontubes, ein 5-minütiges Zentrifugieren bei 1200U/min und ein Absaugen des entstandenen Überstandes.

Ferner wurden 10ml hypotoner KCl-Lösung hinzugefügt, um eine Hämolysen der Erythrozyten zu bewirken. Es folgten eine 18-minütige Inkubation mit KCl bei Raumtemperatur, eine Anfixierung mit 1ml Fixativ, ein Aufschütteln und ein erneutes Zentrifugieren (5 Minuten 1200U/min)

In den drei folgenden identischen Waschschritten wurden jeweils der Überstand abgenommen, 10ml Fixativ hinzugegeben und erneut abzentrifugiert. Während einer Ruhephase der Zellsuspension bei –20 °C über 45

Minuten erfolgte die weitgehend vollständige Denaturierung vorhandener Proteine; danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit Zentrifugieren und Absaugen wie oben beschrieben. Das entstandene Zell-Pellet wurde in 1 bis 2ml Fixativ (je nach Zellmenge) resuspendiert und so über Jahre hinweg haltbar gemacht.

#### 2.1.2 Aufarbeitung der Spermienzellen

Verwendete Lösungen:

1xPBS

47,75g PBS (Biochrom KG®) wurden auf 1l Aqua dest. aufgefüllt, der pH-Wert auf 7,2 eingestellt.

Fixativ (Methanol-Eisessig)

Methanol (Merck®) und Eisessig (Merck®) wurden im Verhältnis 3:1 gemischt.

Die Aufarbeitung der Spermienzellen erfolgte nach einem etablierten Protokoll (Anahory et al. 2005). Es erfolgten: Zugabe von PBS zur Probe (ca. 9ml PBS auf 1ml Samenflüssigkeit), 5-minütiges Abzentrifugieren bei Raumtemperatur (2000U/min) und anschließendes Absaugen des Überstandes. Diese Waschschrift wurden insgesamt dreimal wiederholt. Wie bei der Lymphozytenpräparation wurde das entstandene Zell-Pellet in 1 bis 2ml Fixativ (je nach Zellmenge) resuspendiert und so über Jahre hinweg haltbar gemacht.

#### 2.1.3 Aufarbeitung des Gehirngewebes

Das verwendete Gehirngewebe wurde von der Arbeitsgruppe I.Y. Iourov (Laboratory of Cytogenetics, Mental Health Research Center der Russian Academy of Medical Sciences Moskau) zur Verfügung gestellt und nach bekanntem Protokoll präpariert (Iourov et al. 2006).

#### 2.1.4 Aufarbeitung des Knochenmarks

Das verwendete Knochenmarksgewebe wurde von der Arbeitsgruppe Tumorgenetik am Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena zur Verfügung gestellt und analog zu den Blutlymphozyten präpariert.

### 2.2 Vorbereitung der FISH-Sonden

Die FISH-Sonden wurden grundsätzlich nach einem identischen Schema hergestellt, bei dem Fluoreszenzfarbstoffe mittels DOP-PCR, in Einzelfällen auch mittels Nick-Translation an DNA-Banken gekoppelt wurden, die wiederum Sondenfunktion für bestimmte Abschnitte menschlicher Chromosomen besitzen.

#### 2.2.1 DNA-Sonden

##### 2.2.1.1 Multicolor-banding Sonden

Multicolor-banding (MCB) Sonden setzen sich aus einzelnen, im Rahmen der Mikrosequenzierung (Rubtsov et al. 1996) menschlicher Metaphasechromosomen gewonnenen und durch PCR amplifizierten DNA-Banken zusammen. Von der Arbeitsgruppe Molekulare Zytogenetik Jena wurde auf Basis dieser Technik ein Konzept entwickelt, das für jedes menschliche Chromosom ein spezifisches Sonden-Set beinhaltet. (Liehr, et al. 2002b).

##### 2.2.1.1.1 Markierungs-PCR

Die MCB-Sonden wurden in einer Markierungs-PCR nach einem etablierten Markierungs-Schema mit entsprechend modifizierten Nukleotiden (SpectrumGreen™-dUTP, SpectrumOrange™-dUTP, TexasRed™-dUTP, Diethylaminocumarin und Biotin-16-dUTP) markiert.

#### Verwendete Lösungen:

Steriles Wasser (Aqua ad iniectionabilia)

H<sub>2</sub>O (Ampuwa) von Braun®, steril und pyrogenfrei

GeneAmp®-10x-PCR-Puffer-II

GeneAmp®-10x-PCR-Puffer-II (Perkin Elmer®); 100mM Tris-HCl; pH 8,3; 500 mM KCl

DOP-Primer

Sequenz: 5'CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'

Der verwendete degenerierte Oligonukleotid-Primer wurde von Dr. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie Jena zur Verfügung gestellt.

Stammlösung: 40µM; Endkonzentration: 5µM

Amplitaq® DNA-Polymerase

Perkin Elmer®, thermostabil, Konzentration: 5U/µl

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)

Stammlösung: 25 mM; Endkonzentration: 2,5mM

Nukleotide

GeneAmp®-dNTP's (Perkin Elmer®), Lösung von 2mM dATP, dCTP, dGTP und 1mM dTTP.

Die Konzentration von dTTP war geringer gewählt worden, da an seiner Stelle die dUTP-gebundenen Fluorochrome in die DNA eingebaut wurden. Fluorochrome und deren Eigenschaften sind in Tab. 2.1 aufgelistet.

#### Fluorochrome:

Fluorochrom	Hersteller	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Diethylaminocumarin (DEAC)	NEN Life Science Products, Inc.	426 nm	480 nm
SpectrumGreen™-dUTP (SG)	Vysis®	497 nm	524 nm
SpectrumOrange™-dUTP (SO)	Vysis®	559 nm	588 nm
ChromaTide-TexasRed-12-dUTP (TR)	Molecular Probes®	595 nm	615 nm
Biotin-16-dUTP (detektiert mit Streptavidin-Cy5)	Boehringer Mannheim®	649 nm (Streptavidin-Cy5)	670 nm (Streptavidin-Cy5)

Tabelle 2.1 Übersicht über die verwendeten Fluorochrome

#### Durchführung Markierungs-PCR:

Die oben genannten Substanzen wurden unter sterilen Bedingungen im folgenden Mengenverhältnis zusammengefügt und mit jeweils 2µl DNA aus der MCB-Bank (s.o.) versetzt, die mit dem gewünschten Farbstoff markiert werden sollte:

Substanz:	Menge:
Wasser	12,08µl
GeneAmp Puffer	2µl
DOP-Primer	1µl
Nukleotide (unmarkiert)	2µl
MgCl <sub>2</sub>	2µl
Fluorochrom-gekoppelte Nukleotide	0,4µl DEAC oder 0,8µl TR oder 1µl Biotin-dUTP oder 2µl SG oder 2µl SO
AmpliTaq	0,12µl

Es erfolgte die Markierungs-PCR in sterilen 500µl-Reaktionsgefäßen (Eppendorf®) im Thermocycler (PTC-200, MJ Research) nach dem standardisierten PCR-Programm „Label 30“. Die einzelnen Schritte beschreibt Tab. 2.2.

Nummer	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	94 °C	3min
2	Denaturierung	92 °C	1min
3	Primer-Bindung	56 °C	1min
4	Elongation	72 °C	2min
5		Erwärmung bis 74 °C bei je 0,1 °C/s	
6	Wiederholung ab Schritt 2 auf insgesamt 30 Zyklen		
7	Elongation	72 °C	5min
8	Abbruch der PCR	4 °C	

Tabelle 2.2 PCR-Schritte bei der Markierungs-PCR

#### 2.2.1.1.2 DNA-Fällung

Verwendete Lösungen:

Natrium-Acetat-Lösung 3M

24,6g wasserfreies Natriumacetat (Sigma®) wurden auf 100ml A. dest. aufgefüllt und auf pH 5,2 eingestellt.

t-RNA

Stammlösung Roche®, 10µg/µl

Ethanol

(Merck®)

Steriles Wasser (Aqua ad iniectionabilia)

H<sub>2</sub>O (Ampuwa) von Braun®, steril und pyrogenfrei

Dextransulfat (DS)

2g DS, 2ml 20xSSC, 2ml 0,5M Natriumphosphat, 5ml deionisiertes Formamid wurden auf 10ml mit Aqua dest. aufgefüllt und bei 70 °C ca. 3 Stunden aufgelöst.



Nach erfolgter PCR wurden die PCR-Produkte pro einfachem Markierungs-Ansatz mit 10µl t-RNA, 5µl Natriumacetat, 130µl Ethanol, sowie, bei kleinen DNA-Mengen, 20µl sterilem Wasser zur Präzipitation weiterverarbeitet. Diese erfolgte für 20 Minuten bei –80°C oder über Nacht bei –20°C.

Danach wurden die Produkte für 15 Minuten bei 1500U/min und 4°C zentrifugiert, wobei die entstandene DNA-Sonde schließlich als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ausfiel. Es erfolgte das grobe Abpipettieren des flüssigen Überstandes und schließlich die Entfernung der verbleibenden Flüssigkeit in einer Vakuumzentrifuge durch eine 10-minütige Zentrifugation. Das so getrocknete DNA-Pellet wurde schließlich in 25µl Dextransulfat aufgenommen und vollständig gelöst.

#### 2.2.1.2 BCR-ABL - Sonden

Für die BCR-ABL – Untersuchungen wurden kommerzielle BCR-ABL – Sonden (Vysis®) verwendet.

#### 2.2.2. RNA-Sonden

##### 2.2.2.1 Amplifizierung

Das Plasmid für die XIST-RNA-Sonde wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe C. Brown (Department of Medical Genetics, University of British Columbia in Vancouver, Kanada) zur Verfügung gestellt. Die Amplifizierung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Molekulargenetik am Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena

##### 2.2.2.2 Nick Translation mit Biotin-11-dUTP

Verwendete Lösungen:

Sonde

3µl der amplifizierten XIST-Sonde (DNA-Gehalt 380µg/ml; entspricht ca. 1µg DNA)

Nick Translations-kit

4µl Biotin Nick Translation Mix (Roche®)

Steriles Wasser (Aqua ad iniectabilia)

13µl H<sub>2</sub>O (Ampuwa) von Braun®, steril und pyrogenfrei

EDTA

1µl 0.5M EDTA (pH 8.0)

XIST-Sonde, Biotin-Mix und 13µl Aqua dest. wurden zusammengefügt und für 90 Minuten bei 15°C inkubiert, danach unter Zugabe von EDTA noch einmal für 10 Minuten bei 65°C zum Abbruch der Reaktion geführt. Die Fällung erfolgte wie in 2.2.1.1.2.

## 2.3 Durchführung der FISH

### 2.3.1 konventionelle FISH

#### 2.3.1.1 Vorbereitung der Zellen und Pepsinverdau

Die Vorbereitung der konventionellen FISH erforderte durch ein Aufbringen der Zellen auf einen Objektträger sowie den Verdau zytoplasmatischer Bestandteile durch Pepsin-Lösung bei einem entsprechend sauren pH-Wert, um die Metaphasechromosomen, bzw. Interphasekerne möglichst isoliert darzustellen. Dies war Voraussetzung für eine optimale Hybridisierung.

Verwendete Lösungen:

Fixativ

Gemisch aus Methanol (Merck®) und Eisessig (Merck®) im Mischungsverhältnis 3:1

Aufsteigende Ethanolreihe

mit Aqua dest. auf 70% und 95% verdünnter absoluter Ethanol (Merck®) und als abschließendem Schritt 100% Ethanol

Pepsinstammlösung

1g Pepsin (Sigma®) auf 50ml A. dest.

HCl

10mM HCl-Lösung (95ml A.dest., 5ml 0,2n HCl), auf 37 °C erwärmt

1xPBS

Lösung von 9,55g/l PBS (Biochrom KG®); 47,75g auf 5l Aqua dest.

Postfixierungs-Lösung

1%-ige Paraformaldehydlösung, gelöst in 1xPBS mit 50mM  $MgCl_2$  (500  $\mu$ l Paraformaldehyd + 450  $\mu$ l 1xPBS + 50 $\mu$ l  $MgCl_2$ )

Im Rahmen der konventionellen FISH wurden die in 2.1.1 kultivierten und in Fixativ fixierten Lymphozyten auf Objektträger aufgetropft, bei 50 °C getrocknet, in der aufsteigenden Ethanolreihe jeweils drei Minuten entwässert und über Nacht zur Alterung in einem Trockenschrank untergebracht.

Danach erfolgte die Zugabe der Pepsinstammlösung in der HCl-Lösung in einer Küvette im Wasserbad bei 37 °C und unmittelbar darauf die Inkubation des Objektträgers in der Küvette für 5 Minuten. Es folgte die Waschung des Objektträgers in einer Küvette mit 1xPBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Daran schloss sich ein Postfixierungsschritt an, bei dem der Objektträger mit einem locker aufgelegten Deckglas, auf das zuvor 100 $\mu$ l der 1%-igen Postfixierungs-Lösung aufgebracht worden waren, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Es erfolgten danach ein weiterer Waschschrift mit 1xPBS und ein Dehydrieren für jeweils 3 Minuten in der aufsteigenden Ethanolreihe.

#### 2.3.1.2 Denaturieren des Objektträgers

Für die Bindung der FISH-Sonden an die chromosomale DNA bzw. die Interphasekerne, musste zunächst eine Denaturierung der Doppelstränge erfolgen.

#### Verwendete Lösungen:

##### 70%-ige Formamid-Lösung

140ml Formamid + 40ml Aqua dest. + 20ml 20xSSC-Lösung (Lösung von 87,65g NaCl, 44,10g Natriumcitrat auf 500ml Aqua dest., gebrauchsfertig)

##### Aufsteigende Ethanolreihe (modifiziert)

Reihe von Ethanol (Merck®) welcher mit A. dest. auf 70% und 95% verdünnt wurde, der 70%-ige Ethanol ist auf –20°C gekühlt, abschließender Schritt mit absolutem Ethanol

Der vorbereitete Objektträger wurde in einem ersten Denaturierungsschritt bei 72°C auf einer Heizplatte erwärmt. Es folgte die Inkubation mit 100µl des 70%-igen Formamids für 3 Minuten, ebenfalls bei 72°C. In einem folgenden Schritt wurde der Objektträger vom Deckglas befreit und in der modifizierten aufsteigenden Ethanolreihe (70% bei –20°C, danach bei Raumtemperatur) dehydriert.

#### 2.3.1.3 Prähybridisierung der Sonden

Es erfolgte in diesem Schritt die Denaturierung der doppelsträngigen Sonden-DNA, ferner wurden für eine möglichst spezifische Bindung der Sonde an die gewünschte chromosomale Sequenz im Prähybridisierungsschritt mit Hilfe der Cot-1-DNA unspezifische repetitive Sequenzen abgeblockt.

#### Verwendete Lösungen:

##### Cot-1-DNA (100 µg)

Je nach DNA-Menge in der Sonde wurde die jeweils benötigte Menge Cot-1-DNA (1mg/ml, GibcoBRL®) mit dem doppelten Volumen absolutem Ethanol versetzt und in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet.

Jeweils 4µl der gewünschten Sonde, 6µl Dextransulfat und 10µg der eingetrockneten Cot-1-DNA wurden im Thermocycler (PTC-200, MJ Research) mit dem Programm „Prehyb“ (Schritte in Tab. 2.3) prähybridisiert.

Nummer	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	75°C	5min
2	Verhinderung Renaturierung	4°C	2min
3	Blockierung repetitiver Sequenzen durch die Cot- 1-DNA	37°C	30min

Tabelle 2.3: Schritte Prähybridisieren

#### 2.3.1.4 Hybridisierung, Detektion und Waschung

Es folgten die Hybridisierung der Sonden und Objektträger, die Detektion des in den Sonden verwendeten Biotins mit Strept-Avidin-Cy 5 sowie das Auswaschen des überschüssigen, nicht hybridisierten Sondenmaterials. Eine Gegenfärbung verhinderte das Ausbleichen.

#### Verwendete Lösungen:

##### 20xSSC

GibcoBRL®, 3,0M Natriumchlorid + 0,3M Natriumcitrat

##### 1xSSC

25ml 20xSSC + 475ml Aqua dest. auf pH 7,0 – 7,5 mit 1n HCl einstellen

##### 4xSSC/T

100ml 20xSSC + 400ml Aqua dest. + 250µl Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat, Sigma®), auf pH 7,0 – 7,5 einstellen mit 1n HCl

##### 4xSSCTM

0,25g Milchpulver (Marvel®) wird in 2ml 4xSSC/T gelöst und anschließend bei 1500U/min zentrifugiert

##### 1xPBS

Lösung von 9,55g/l PBS (Biochrom KG®); 47,75g auf 5l Aqua dest.

##### Aufsteigende Ethanolreihe

mit Aqua dest. auf 70% und 95% verdünnter absoluter Ethanol (Merck®) und im abschließenden Schritt mit absolutem Ethanol

##### Strept-Avidin-Cy 5

Amersham®, Lösung im Mischungsverhältnis 3:100 mit 4xSSCTM

##### DAPI/Antifade

ca. 0,25% 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma®), Stocklösung: 5µg/ml wird mit Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories®) ansetzen, ist bei 4 °C lichtgeschützt zu lagern.

Zunächst wurden die prähybridisierten Sonden auf die denaturierten Objektträger aufgebracht, luftdicht verschlossen und in einer feuchten Kammer bei 37 °C über Nacht hybridisiert.

Danach wurden die Objektträger zunächst bei 68 °C in 1xSSC für 5 Minuten, danach bei Raumtemperatur in 4xSSCT für 5 Minuten gewaschen.

Es folgten die Blockung unspezifischer Antikörperbindungsstellen durch eine Inkubation mit 100µl 4xSSCTM bei 37 °C unter einem Deckglas und direkt im Anschluss daran die Detektion der indirekt markierten Biotin-Sonden mit 100µl des Strept-Avidin-Cy5-Gemisches für 40 Minuten, ebenfalls unter einem Deckglas bei 37 °C.

Schließlich wurde erneut jeweils für 5 Minuten in 4xSSCT und 1xPBS bei Raumtemperatur gewaschen und abschließend in der Alkoholreihe dehydriert. Im letzten Schritt wurde der Objektträger mit 20µl DAPI/Antifade eingedeckt.

#### 2.3.2 DNA-S-FISH

Die DNA-S-FISH erfolgte prinzipiell in identischen Schritten wie die konventionelle FISH. Jedoch erfolgten sämtlich Schritte nicht mit aufgetropften Zellen auf Objektträgern, sondern an durchgehend in Suspension befindlichen Zellen in Lösung in 500µl Eppendorf®-Reaktionsgefäßen (Steinhaeuser et al. 2002).

### 2.3.2.1 Vorbereitung der Zellen und Pepsinverdau

Verwendete Lösungen:

Fixativ

Gemisch aus Methanol (Merck®) und Eisessig (Merck®) im Mischungsverhältnis 3:1

Methanol (Merck®)

Isotone Kochsalzlösung

0,9% Lösung von kristallinem NaCl (Roth®) und A. dest. (Seral®)

Pepsinstammlösung

1g Pepsin (Sigma®) auf 50ml A. dest.

HCl

10mM HCl-Lösung (950µl A.dest., 50µl 0,2n HCl), auf 37 °C erwärmt

In einem 500µl-Reaktionsgefäß wurde die Zellsuspension, die wie in Schritt 2.1.1. bis 2.1.4 gewonnenen worden war und ein sichtbares Zellpellet in Fixativ-Lösung aufwies, in einem ersten Schritt für 10 Minuten bei 1500U/min bei 4 °C zentrifugiert. (Diese Zentrifugationsparameter wurden in sämtlichen S-FISH-Schritten angewandt.) Der Überstand wurde abgenommen, 500µl Methanol wurden für 2 Minuten hinzugegeben, um die Fixativ-Lösung auszuwaschen, danach wurde erneut zentrifugiert.

Wiederum wurde der Überstand abgenommen, 500µl Kochsalzlösung wurden für 3 Minuten hinzugegeben, um das Methanol auszuwaschen, danach wurde erneut zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder abgenommen, 500µl Pepsin-HCl-Lösung (2,5µl Pepsinstammlösung auf 500µl HCl) wurden für 5 Minuten bei 37 °C im Wasserbad hinzugegeben, danach wurde erneut zentrifugiert.

Wiederum wurde der Überstand abgenommen, 500µl Kochsalzlösung wurden für 2 Minuten hinzugegeben, um die Pepsinlösung auszuwaschen, danach wurde erneut zentrifugiert und der Überstand bis auf 30µl abgenommen.

### 2.3.2.2 Denaturierung

Um zusätzliche Exposition der empfindlichen suspendierten Zellkerne gegenüber aggressiven Reagenzien zu vermeiden, erfolgte die Denaturierung ausschließlich über Temperaturexposition. Hierbei wurden das Reaktionsgefäß in einem Cycler (PTC-200, MJ Research®) im Programm 95Denat zunächst bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Anschließend wurde sofort auf 4 °C gekühlt, um einer raschen Renaturierung der DNA entgegenzuwirken.

### 2.3.2.3 Prähybridisierung der Sonden

Dieser Schritt erfolgte analog wie Schritt 2.3.1.3 bei der konventionellen FISH. Jedoch machten die erhöhte Zellmenge und verlängerte Diffusionsstrecken bei der S-FISH eine höhere Menge von Sonde und Cot1-DNA erforderlich. Es wurden 25µl Sonde, 50µl Cot1-DNA und kein weiteres Dextransulfat verwendet.

### 2.3.2.4 Hybridisierung, Detektion und Waschung

Auch diese Schritte lehnten sich prinzipiell an die in der konventionellen FISH an. An ihrem Ende wurden die Gegengefärbten Zellen in einem DAPI-Antifade-Gel eingebettet.

## Verwendete Lösungen:

### 20xSSC

GibcoBRL®, 3,0M Natriumchlorid + 0,3M Natriumcitrat

### 0,4xSSC

10ml 20xSSC + 490ml Aqua dest. auf pH 7,0 – 7,5 mit 1n HCl einstellen

### 4xSSC/T

100ml 20xSSC + 400ml Aqua dest. + 250µl Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat, Sigma®), auf pH 7,0 – 7,5 einstellen mit 1n HCl

### 4xSSCTM

0,25g Milchpulver (Marvel®) wird in 2ml 4xSSC/T gelöst und anschließend bei 1500U/min zentrifugiert

### Strept-Avidin-Cy 5

Amersham®, Lösung im Mischungsverhältnis 3:100 mit 4xSSCTM

### DAPI/Antifade

Ca. 0,25% 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma®), Stocklösung: 50µg/ml wurde mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories®) angesetzt, ist bei 4°C lichtgeschützt zu lagern.

### Isotone Kochsalzlösung

0,9% Lösung von kristallinem NaCl (Roth®) und A. dest. (Seral®)

### 1%-iges Agarosegel

0,25g Agarose wurden in 25ml 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung bei 600W in der Mikrowelle gelöst.

### 0,5% DAPI-Vectashield-Gel

2ml des noch flüssigen 1%-igen Agarosegels wurden mit 2ml Vectashield und 1,5µl Antifade-Lösung vermischt. Das erkaltete Gel war bei 4°C über Monate haltbar.

Sonde und Suspension wurden zusammengeführt, im Wasserbad im Mikrowellenherd zur Erhöhung der Effizienz schonend auf 37°C erwärmt (Weise et al. 2005) und über Nacht bei 37°C im Brutschrank hybridisiert. Danach wurden im ersten Waschschrift zunächst 500µl 0,4xSSC für 2 Minuten bei 68°C im Wasserbad zugegeben. Danach wurde abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen, es wurden 500µl 4xSSCT für 2 Minuten bei Raumtemperatur dazugegeben und wiederum abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen, es erfolgte zum Blocken die Inkubation mit 250µl 4xSSCTM bei 37°C für 15 Minuten. Danach wurde abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen. Es erfolgte zur Detektion die Inkubation mit 200µl des Streptavidin-Cy5-Gemisches bei 37°C für 40 Minuten. Danach wurde abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen, es erfolgte die Waschung zunächst mit 500µl 4xSSCT bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Danach wurde abzentrifugiert.

Es folgte die Zugabe von 150µl DAPI/Antifade-Lösung für 10 Minuten, um eine vollständige Diffusion der Lösung in die Kerne zu gewährleisten.

Danach wurden 350µl Kochsalzlösung hinzugefügt, um die Viskosität herabzusetzen und das nötige Abzentrifugieren zu ermöglichen. Danach wurde der Überstand abgenommen, um das Zellpellet im letzten Schritt im Gel zu fixieren.

Dazu wurden etwa 50µl des DAPI-Vectashield-Gels wieder in der Mikrowelle verflüssigt, vorsichtig mit dem Zellpellet vermischt und auf gekammerte Objektträger (Superfrost® Plus 3-Chamber-Slides, MJ Research®) mit einem Kammervolumen von 15µl gegeben und mit einem Deckglas von 24 x 60 mm abgedeckt.

### 2.3.3 kombinierte DNA / RNA-S-FISH

Dieses Verfahren beinhaltet im Wesentlichen die Schritte der einfachen DNA-S-FISH. Lediglich ein Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt in der Vorbereitungsphase sowie ein modifiziertes Verfahren zur Denaturierung bildeten die Unterschiede und sind unten aufgeführt. Eine verkürzte Denaturierung war vonnöten, weil nur bei inkomplett denaturierter Doppelstrang-DNA auch eine Hybridisierung der Sonde an die XIST- RNA möglich war. Das im Rahmen dieser Arbeit erstmals etablierte Verfahren zur kombinierten DNA / RNA-S-FISH orientierte sich an bekannten konventionellen FISH-Protokollen mit reinen RNA-Sonden (Lawrence et al. 1989) sowie mit kombinierten DNA- und RNA-Sonden (Heard et al. 1999).

#### 2.3.3.1 Vorbereitung der Zellen und Pepsinverdau

Verwendete Lösungen:

s. 2.3.2.1, zusätzlich:

Cytoskeletal (CSK-)Buffer:

3ml Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) 1M,

20ml NaCl (Roth®) 5M,

102,6g Sucrose (Roth®),

3,02g PIPES (Roth®) in 100ml A.dest. gelöst, pH 6,8

NaOH hinzugefügt bis pH 6,8 (bis eine klare Flüssigkeit entstand)

Mit A.dest. bis auf 1l aufgefüllt, danach in 2ml Reaktionsgefäßen aliquotiert.

CSK "complete":

2ml CSK,

10µl Triton X-100 (NeoLab Migge®),

10µl EGTA 200mM

20µl Vanadyl ribonucleoside complex (VRC, Sigma®)

Paraformaldehyd

4%-ige Lösung von Paraformaldehyd-Pulver (Sigma®)

Ethanol 70%

mit Aqua dest. auf 70% verdünnter absoluter Ethanol (Merck®)

Das Verfahren verlief wie unter Punkt 2.3.2.1 bis zum Auswaschen des Methanols durch Kochsalzlösung.

Danach erfolgte eine Zugabe von 500µl CSK „complete“ mit einer anschließenden Inkubation von 7 Minuten auf Eis. Danach wurde abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen. Es folgte eine Zugabe von 500µl Paraformaldehyd mit Inkubation für 10 Minuten, ebenfalls auf Eis. Danach wurde abzentrifugiert.

Es schloss sich ein Waschschrift in 500µl 70%-igem Ethanol an. Nach erfolgtem Aufschütteln wurde abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 500µl Kochsalzlösung für 3 Minuten. Danach wurde abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen. Dann wurde weiter wie in Punkt 2.3.2.1 verfahren.

#### 2.3.3.2 Denaturierung

Wie oben erwähnt, war bei der kombinierten DNA / RNA-S-FISH ein Kompromiss bei der Denaturierung nötig. Es wurde nur für 90 Sekunden im Thermocycler (PTC-200, MJ Research®) im Programm 95Denat denaturiert, danach folgte bereits die Abkühlung auf 4 °C für mehr als 2 Minuten.

#### 2.3.3.3 Prähybridisierung der Sonden

Die Prähybridisierung erfolgte wie in 2.3.2.3

#### 2.3.3.4 Hybridisierung, Detektion und Waschung

Diese Schritte erfolgten wie in 2.3.2.4

### 2.4 Optische und digitale Analyse

#### 2.4.1 konventionelle FISH

Basis für diese Analysen waren ein Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss®) sowie eine Standard-CCD-Kamera (IMAC®), die Verarbeitung erfolgte mit der Isis®-Software der Firma Metasystems GmbH, Altlussheim.

#### 2.4.2 S-FISH

Für diese komplexere, weil dreidimensionale Bildanalyse waren neben o.g. Mikroskop eine spezielle 12bit-CCD-Kamera (FView2®) und die für diesen Zweck entwickelte CellP®-Software von Soft Imaging System GmbH, Münster (inzwischen Olympus) notwendig. Kernstück dieser Software war die Möglichkeit, den Kern als einen Stapel in der Z-Ebene bestehend aus mehreren Einzelbildern aufzunehmen, und diesen danach digital zu einem 3D-Bild unter Verwendung eines Dekonvolutionsfilters zu präsentieren. Ferner wurde die Berechnung einzelner Koordinaten aber auch von Entfernungen als Vektoren im dreidimensionalen Raum möglich.

#### 2.4.3 Dielectric Field Cage Chip (DFC-Chip)

Für die Arbeiten mit dem DFC-Chip wurde wie unter Punkt 2.3.2.4 verfahren. Allerdings verblieben die fertig hybridisierten und gewaschenen Kerne in der abschließenden Suspension mit DAPI-Antifade, es entfielen also die Schritte der Kochsalzzugabe und Geleinbettung. Die Suspension wurde dann in den DFC-Chip eingebracht. Dieser Vorgang geschah in enger Kooperation in den Laboratorien der Firma Zeiss®. Als Mikroskop wurde dort ein Laser Scanning Mikroskop 510 eingesetzt, die digitale Verarbeitung erfolgte mit der Software AxioVision (beides Zeiss®-Produkte).





In einem Ausblick zur Weiterentwicklung wurde weiterhin ein neues, sich noch in der Erprobung befindliches Verfahren eingesetzt. Für noch präzisere Daten galt für die Zukunft ein Verfahren als wünschenswert, bei dem der jeweils untersuchte Kern von zwei Seiten aus in einem 90°-Winkel in seine Z-Stapel zerlegt aufgenommen werden konnte. Dies war grundsätzlich gewährleistet in einem sogenannten Dielectric Field Cage (= DFC)-Chip (Abb. 3.2). In einem solchen Chip konnte der Kern zunächst in einem speziell angelegten elektrischen Feld fixiert und so von der Kamera – hier bot sich das Laser Scanning Mikroskop im Labor der Firma Zeiss®, für das dieser Chip entwickelt wurde, an – aufgenommen werden. In einem zweiten Schritt wurde durch Änderung des elektrischen Feldes der Kern in einem exakt bestimmten Winkel gedreht und nochmals, diesmal von einer anderen Seite aus, als Z-Stapel aufgenommen. Abb. 3.2 a) zeigt die vier Elektroden des Dielectric Field Cages mit einem in der Mitte fixierten Kern, Abb. 3.2 b) zeigt eine Probeaufnahme eines S-FISH präparierten Kernes im Laser Scanning Mikroskop.

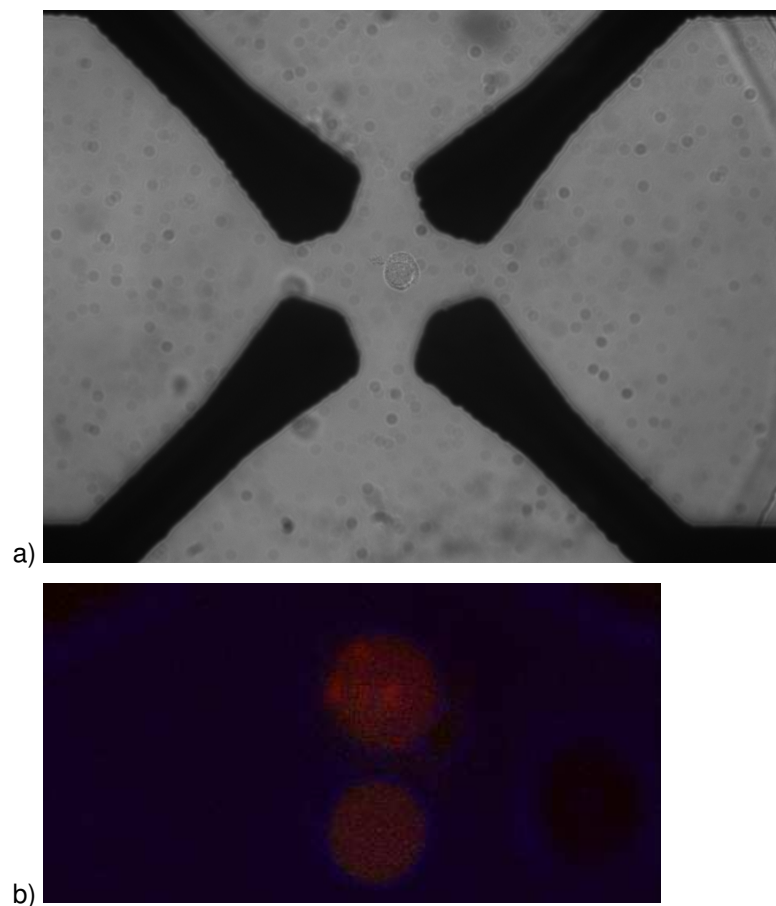


Abb. 3.2 Lymphozytenkern fixiert in einem Dielectric Field Cage a) fixierter Kern zwischen den Elektroden des Chips b) Signale (einfarbig in TexasRed) im fixierten Kern unter dem Laser Scanning Mikroskop LSM 510 der Firma Zeiss®

## 3.2 Studien zur X-Inaktivierung an Lymphozyten

### 3.2.1 Zweidimensionale Studien an MCB-gefärbten X-Chromosomen

Aus den in der Einleitung dargelegten Gründen erfolgte die 2D-Untersuchung lediglich zur groben Orientierung der untersuchten chromosomalen Lage sowie um die Effektivität der 2-D mit der der 3-D Studien vergleichen zu können. Ausgewertet wurden insgesamt 977 Interphasekerne. Dabei ergab sich lediglich bei 142 Kernen (14.5%) das volle Bild von 2 voneinander abgrenzbaren Strukturen, die das angewendete MCB-Bandenmuster in Echt- wie auch in Falschfarben annähernd orthogonal zur Chromosomenachse erkennen ließen (s. Abb. 3.3). Die restlichen Kerne zeigten neben mangelhaften Hybridisierungsergebnissen und eindeutigen mechanischen Alterationen Defizite bei der Abgrenzbarkeit der Signale. So fielen Kerne auf, bei denen die gefärbten X-Chromosomen einander in den verschiedensten Konstellationen überlagerten. Bei der Draufsicht mit nur einem einzigen Bild war es größtenteils unmöglich, aus derartigen Konglomeraten heraus die einzelnen Chromosomen zu differenzieren und zu analysieren. Ebenfalls fanden sich Kerne, bei denen Knicke, keine eindeutige Chromosomenachse oder ähnliche mechanische Alterationen vorlagen. Dies betraf sowohl die Abgrenzbarkeit der beiden Chromosomen zueinander, als auch die einzelner Chromosomen in sich durch starke Knickbildung und intrachromosomale Überlagerungsartefakte.

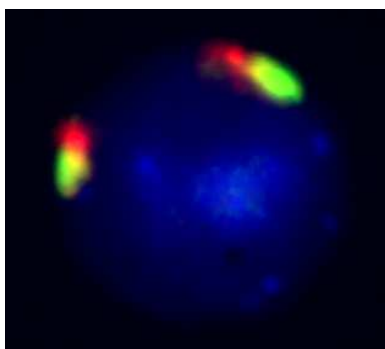


Abb. 3.3 Ergebnis 2D-MCB X-FISH in Echtfarben. Dargestellt sind programmbedingt lediglich die Banden in SpectrumOrange (rot), Biotin/Cy5 (gelb) und SpectrumGreen (grün) sowie die Kernfärbung in DAPI (blau)

Die jeweiligen Längen der Chromosomen wurden gemessen und miteinander ins Verhältnis gesetzt, wobei ein längeres  $X_{\text{lang}}$  von einem kürzeren  $X_{\text{kurz}}$  unterschieden wurde. Zum besseren Vergleich wurde ein Quotient  $X_{\text{lang}}/X_{\text{kurz}}$  erstellt. Beim Vergleich zeigte sich, dass  $X_{\text{lang}}$  im arithmetischen Mittel 1,32-mal länger war als  $X_{\text{kurz}}$ . Die

Bandbreite des Quotienten variierte zwischen 2,41 und 1,0. Bei 17 der 142 vermessenen Kerne ergab sich dabei ein Quotient von lediglich 1,0 bis 1,05.

### 3.2.2 Dreidimensionale Studien an MCB-gefärbten X-Chromosomen

Bei den S-FISH-MCB X-Hybridisierungen auf periphere Lymphozyten zeigten sich bei einem großen Teil der untersuchten Kerne nach digitaler Bildanalyse klar Strukturen, in denen die MCB-Sequenz des angewendeten Markierungsschemas durchaus nachvollziehbar war. Allerdings lagen in vielen Kernen gehäuft Artefaktsignale vor, die wohl am ehesten als Resultate einer unvollständigen Auswaschung überschüssigen Sondenmaterials zu interpretieren waren. Daraus ergab sich in einigen Fällen die Unmöglichkeit, die eigentlichen Signale sicher abzugrenzen und in die Messungen mit einzubeziehen. In 42 der 100 untersuchten Kerne zeigte sich kein eindeutiges Hybridisierungsergebnis mit Signalen aller eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe. Zur sicheren Analyse kamen schließlich 30 der 100 untersuchten Kerne in Frage (30%). Auswertbare Kerne sind in Abb. 3.4 und 3.5 zu sehen.

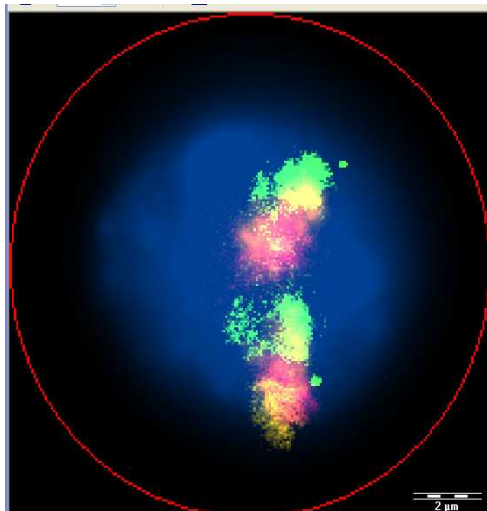
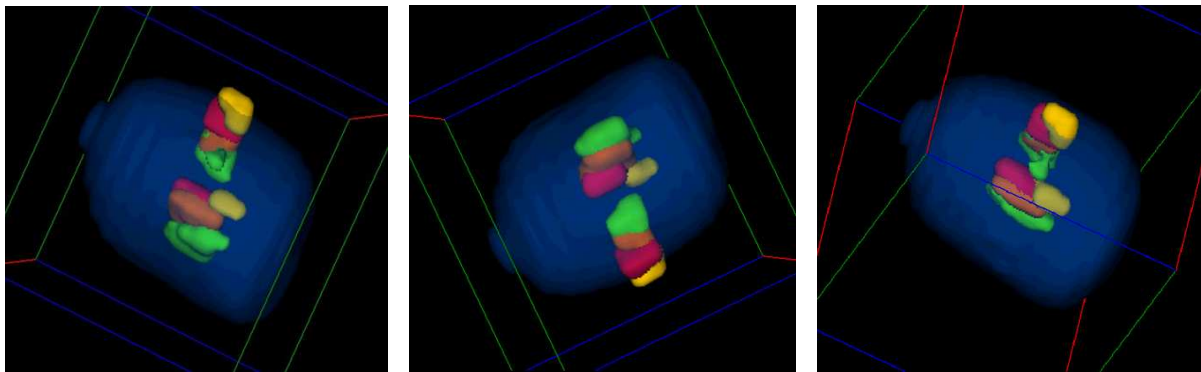
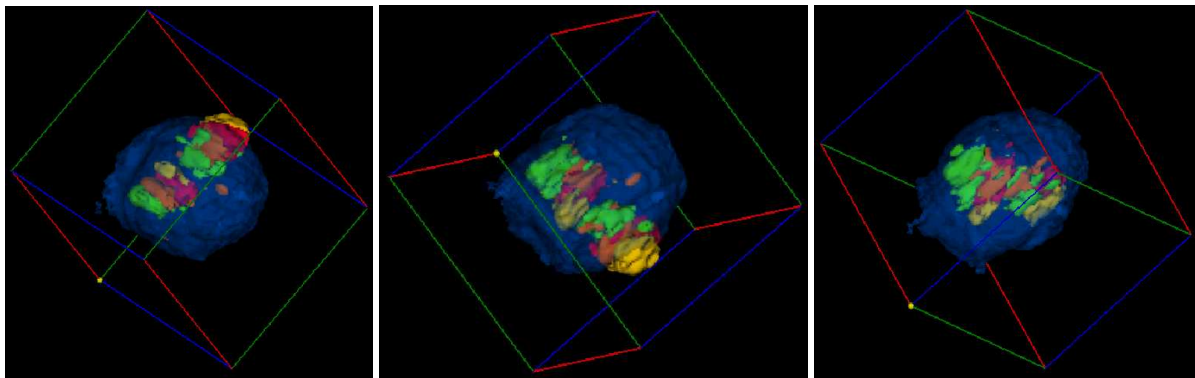


Abb. 3.4 Bildauszug aus einem Z-Stapel eines S-FISH-MCB X hybridisierten Lymphozyten. Zu erkennen sind die Banden in SpectrumOrange (orangerot), TexasRed (magenta), Biotin/Cy5 (gelb) und SpectrumGreen (grün) sowie die Kernfärbung in DAPI (blau)

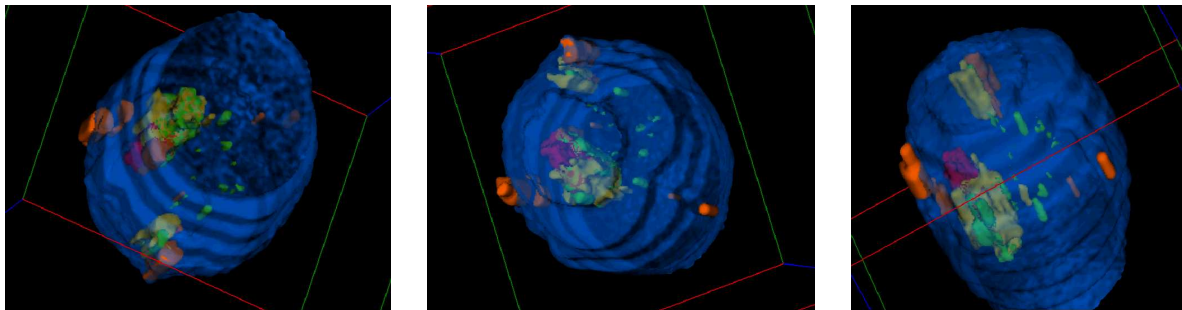
Bei sämtlichen untersuchten Kernen, den verworfenen wie den untersuchten, fiel eine grundsätzliche Tendenz beim Hybridisierungsergebnis auf: Es zeigten sich gehäuft nur schwache oder gänzlich fehlende Banden in den jeweiligen Telomerbereichen bei sonst durchweg guter Hybridisierung der anderen Banden.



a)



b)



c)

Abb. 3.5 Beispiele für drei 3D-rekonstruierte Kerne von S-FISH-MCB X hybridisierten Lymphozyten aus jeweils 3 verschiedenen Positionen. Zu erkennen sind die Banden in SpectrumOrange (orangerot), TexasRed (magenta), Biotin/Cy5 (gelb) und SpectrumGreen (grün) sowie die Kernfärbung in DAPI (blau); a) stark geglättet zur Artefaktminimierung; b),c) mit geringerer Oberflächenglättung

Zur Untersuchung der verwertbaren Kerne wurde zunächst der Mittelpunkt des sphärischen Kernes mittels eines dreidimensionalen Koordinatensystems ermittelt. In einem nächsten Schritt wurden ebenfalls in diesem Koordinatensystem die Positionen der beiden Chromosomen ermittelt. Um eine repräsentative und reproduzierbare Koordinate für jedes Chromosom zu gewinnen, wurde willkürlich das jeweilige Zentromer gewählt, das sich anhand des MCB-Markierungsschemas sicher

lokalisieren ließ. Aus den gewonnenen Daten wurden mittels einfacher Vektorrechnung die Abstände der zwei Chromosomen vom Kernmittelpunkt im dreidimensionalen Raum errechnet. Anhand dieser Werte konnten für jeden Kern ein peripher und ein kernzentral befindliches X-Chromosom bestimmt werden.

Es wurden ferner zu den beiden dargestellten X-Chromosomen die maximale Länge und Breite im dreidimensionalen Raum ausgemessen. Diese Werte wurden für das jeweils periphere und das zentrale Chromosom miteinander verglichen. Der Vergleich berücksichtigte zunächst Länge und Breite der Chromosomen separat und in einem nächsten Schritt das Produkt aus Länge mal Breite. Dieses wurde ermittelt, um einen Anhaltspunkt für die Ausdehnung bzw. Oberflächenstruktur und damit das genaue Volumen des Chromosoms zu erlangen. Eine Messung des Gesamtvolumens konnte nicht erfolgen, da eine entsprechende digitale Technologie nicht vorlag. Bei lediglich 6 der 30 Kerne zeigten sich keine eindeutig diskriminierbaren Unterschiede (kleiner als  $0,1\mu\text{m}$ ) beim Vergleichen der Maße (in allen dieser Fälle bei der Breite).

Ein einzelner Kern wiederum ergab keinen eindeutigen Unterschied (kleiner als  $0,1\mu\text{m}$ ) bezüglich der Differenzierung eines peripheren von einem zentral lokalisierten Chromosom. Diese 7 Kerne wurden nicht mit in der Auswertung berücksichtigt.

Bei 23 der 30 Kerne ergaben sich klare Konstellationen jeweils eines eindeutig längeren bzw. breiteren Chromosoms. Allerdings war bei 11 der Fälle je ein Chromosom länger, das andere jedoch breiter (Abb. 3.6 d). Die weiteren Ergebnisse sind im Kreisdiagramm in Abb. 3.6 a) bis c) veranschaulicht. Verwendet wurde der Vorzeichen-Test.

Analog zu den Untersuchungen an den zweidimensionalen Kernen unter 3.2.1 wurde auch die Quantität der Längen und Breitenunterschiede ermittelt, wobei ein längeres  $X_{\text{läng}}$  von einem kürzeren  $X_{\text{kurz}}$ , bzw. ein breiteres  $X_{\text{breit}}$  von einem  $X_{\text{schmal}}$  unterschieden wurde. Zum besseren Vergleich wurde erneut ein Quotient  $X_{\text{läng}}/X_{\text{kurz}}$  bzw.  $X_{\text{breit}}/X_{\text{schmal}}$  erstellt.

Beim Vergleich zeigte sich, dass  $X_{\text{läng}}$  im arithmetischen Mittel 1,35 mal länger war als  $X_{\text{kurz}}$ . Die Bandbreite des Quotienten variierte zwischen 2,20 und 1,05.

$X_{\text{breit}}$  hingegen zeigte sich im Mittel 1,37 mal breiter als  $X_{\text{schmal}}$ . Die Bandbreite dieses Quotienten variierte zwischen 2,01 und 1,09.

Bei den Abstandsmessungen der Chromosomen in den Kernen lag jeweils das periphere Chromosom im Mittel 1,54 mal weiter vom Kernmittelpunkt entfernt als das zentralere. Dieser Quotient variierte zwischen 1,08 und 2,32.

Die Rohdaten sind im Anhang unter Tab. 6.1 angehängt. Die SPSS-Auszüge sowie die Ergebnisse weiterer quantitativer Untersuchungen befinden sich im Anhang unter Abb. 6.1 a) bzw. Abb. 6.2.

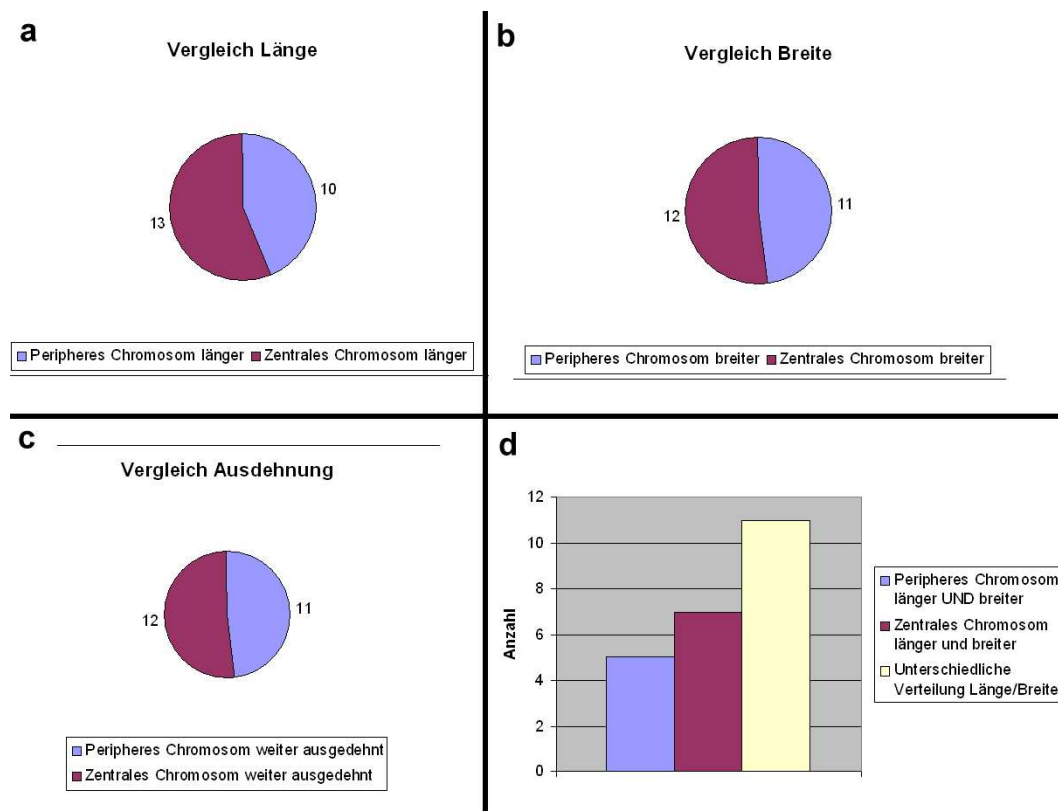


Abb.: 3.6 a) bis c) Verteilung von Länge, Breite und Ausdehnung jeweils des peripheren und zentralen Chromosoms. d) Zusammenfassung Länge und Breite

### 3.2.3 Dreidimensionale Studien mit RNA-XIST-Sonde

Die unter 3.2.2 ermittelten Resultate führten zu einer weiterführenden Untersuchung von X-Chromosomen in S-FISH hybridisierten Lymphozyten in einem kombinierten Ansatz aus herkömmlicher DNA- und spezieller XIST-RNA-FISH.

In ersten Vorversuchen zeigte sich in guten Hybridisierungsergebnissen, dass grundsätzlich die S-FISH-Methode auch mit reiner RNA-FISH kompatibel war. Für den erstmaligen Versuch einer gemeinsamen Anwendung herkömmlicher zweidimensionaler kombinierter RNA- /DNA-FISH-Protokolle und dem bisher beschriebenen S-FISH-Prozedere war jedoch eine Modifikation dessen erforderlich.



Zentrales Problem hierbei war die Anpassung der Denaturierungszeit des Präparates. Wie unter Punkt 2.3.3 ersichtlich, war ein nur teilweise denaturierter Zustand der Doppelstrang-DNA anzustreben, um eine ausreichende Bindung der XIST-Sonde an die XIST-RNA zu gewährleisten, bei dem aber gleichzeitig eine Bindung der DNA-Sonde erfolgen konnte. Verwendet wurden neben der XIST RNA-Sonde die 2 DNA-Sonden, die Bestandteil des MCB X-Markierungsschemas (MCB X 4a und MCB X 3; die 3. und 4. Bande im Schema von Abb. 3.1) sind, und den XIST-Bereich überlappen. Gewählt wurden 2 Sonden, um damit die Chromosomenachse rekonstruieren zu können, und so die Maße für die Breite des Chromosoms und zumindest Anhaltspunkte für die Länge des untersuchten Abschnitts zu erhalten. Von einer Verwendung des gesamten MCB X-Sondenmixes wurde abgesehen, um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten, gerade weil ja durch die Anfärbung der XIST-RNA mit einer Sonde eine Farboption für das MCB weniger vorlag.

Im Ergebnis konnte grundsätzlich bei einem Teil der Kerne ein zufriedenstellendes Hybridisierungsergebnis erzielt werden. Allerdings war die Ausbeute der auswertbaren Kerne noch geringer als bei den Versuchen unter 3.2.2. So konnte in nur 10 der 62 (16%) analysierten Kerne ein eindeutiges Ergebnis wie in Abb. 3.7 beobachtet werden. Die meisten Kerne mussten dabei aufgrund eines fehlenden XIST-RNA-Signals verworfen werden.

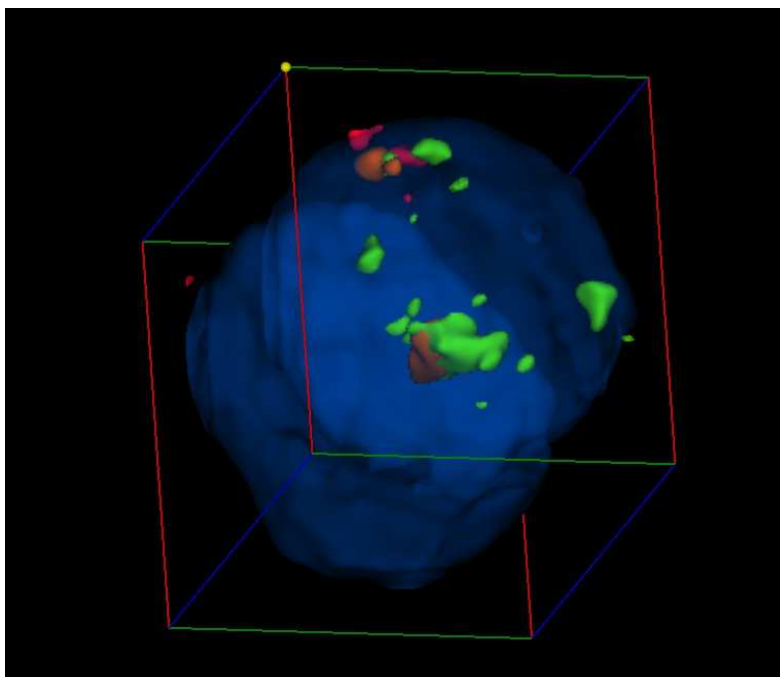


Abb. 3.7 Kombinierte DNA/RNA-FISH bei einem 3D-rekonstruierten Kern eines S-FISH -hybridisierten Lymphozyten. Zu erkennen sind die Banden in MCB X 4a TexasRed (orangerot) und MCB X 3 SpectrumGreen (grün), die XIST-Sonde in Biotin/Cy5 (rot) sowie die Kernfärbung in DAPI (blau)



Analysiert wurden analog zu 3.2.2 Länge und Breite der jeweils aktiv bzw. inaktiv markierten Chromosomen und deren Abstand vom Kernmittelpunkt. Darunter fanden sich ausschließlich Konstellationen, in denen eindeutig ein peripher und ein zentral gelegenes Chromosom unterschieden (Unterschied größer als  $0,1\mu\text{m}$ ) werden konnten. Zwar zeigten sich auch zwei Kerne, bei denen sich keine eindeutig diskriminierbaren Unterschiede (kleiner als  $0,1\mu\text{m}$ ) beim Vergleichen der Breite zeigten, diese wurden jedoch zum Teil aufgrund eindeutiger Unterschiede bei Länge und Ausdehnung trotzdem in der Auswertung berücksichtigt. Verwendet wurde erneut der Vorzeichen-Test. Die Resultate sind in Abb. 3.8 graphisch aufgeführt.

Ebenfalls analog zu den MCB-Untersuchungen an den zweidimensionalen Kernen unter 3.2.1 und den dreidimensionalen unter 3.2.2 wurde auch hier die Quantität der Längen und Breitenunterschiede ermittelt, wobei hier anders als in den vorangegangenen Versuchen Länge und Breite des jeweils aktiv bzw. inaktiv identifizierten Chromosoms verglichen wurde. Wiederum wurde zum Vergleich ein Quotient, in diesem Fall der aus  $\text{Breite } X_{\text{aktiv}}/\text{Breite } X_{\text{inaktiv}}$  bzw.  $\text{Länge } X_{\text{aktiv}}/\text{Länge } X_{\text{inaktiv}}$  erstellt.

Beim Vergleich zeigte sich, dass  $X_{\text{aktiv}}$  im arithmetischen Mittel 2,0 mal länger war als  $X_{\text{inaktiv}}$ . Die Bandbreite des Quotienten variierte zwischen 0,3 und 5,47.

$\text{Breite } X_{\text{aktiv}}/\text{Breite } X_{\text{inaktiv}}$  hingegen betrug im Mittel 1,38. Die Bandbreite dieses Quotienten variierte zwischen 0,32 und 2,38.

Bei den Abstandsmessungen der Chromosomen in den Kernen lag jeweils das inaktive Chromosom im Mittel 1,34 mal weiter vom Kernmittelpunkt entfernt als das Aktive. Dieser Quotient variierte zwischen 0,6 und 3,0.

Die Rohdaten sind im Anhang unter Tab. 6.2 angehängt. Die SPSS-Auszüge sowie die Ergebnisse weiterer quantitativer Untersuchungen befinden sich im Anhang unter Abb. 6.1 b) bzw. Abb. 6.3.

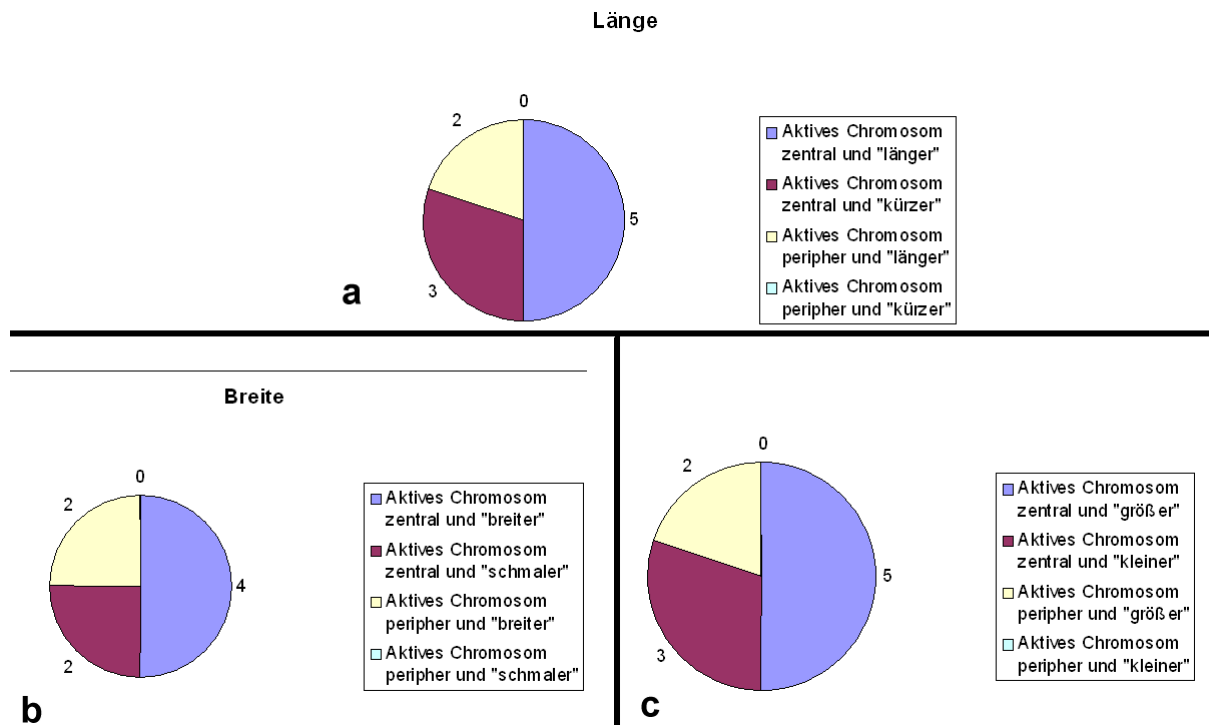


Abb.: 3.8 Verteilung von a) Länge, b) Breite und c) Ausdehnung im Verhältnis zur Position jeweils des aktiven und inaktiven Chromosoms.

### 3.3 S-FISH-MCB-Studien an Spermien

Bei der erstmaligen Untersuchung von Spermien durch eine S-FISH-MCB-Sonde gelang es ebenfalls, grundsätzlich eindeutige Hybridisierungsergebnisse zu erreichen. Unter Berücksichtigung der bereits erwähnten Problematik (3.2.2) des nicht vollständig ausgewaschenen Sondenmaterials, konnte bei diesen Untersuchungen sogar eine höhere Ausbeute an auswertbaren Kernen erzielt werden (im Mittel ca. 50%). Dies lag vor allen Dingen in einer besseren „Übersichtlichkeit“ des nur mit haploidem Chromosomensatz besetzten Kernes, in dem es nur ein Chromosom mit MCB anzufärben galt, und Überlagerungen weitestgehend entfielen. Abb. 3.10 und 3.11 zeigen derartige Spermienkerne.

Die Untersuchungen waren der Beginn einer ausgedehnten vergleichenden Studie an sämtlichen menschlichen Chromosomen zu ihrer Position innerhalb des Spermiums (Manvelyan et al. 2008b). Hierbei gelang es, die Chromosomen anhand ihrer Position im Kern („Kopf“- oder „Schwanzbereich“, bzw. Mittelteil dazwischen), ihrer Linearität, ihrer Lage zum Kernmittelpunkt und ihrer Ausrichtung entlang einer virtuellen Kernachse, orientiert an einer schwanzwärts erkennbaren Ausbuchtung des Kernes zu charakterisieren. Die Parameter sind in Abb. 3.9 schematisch und mit Beispielen unterlegt dargestellt. Es konnte eine Systematik aufgestellt werden, in der

die Chromosomen in verschiedene Gruppen, orientiert an den im ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature; s. Einleitung) bekannten Gruppen A bis G (unterteilt nach Größe, Form und Zentromerposition), charakterisiert wurden. Für die Gruppen A und B ergab sich, dass die Chromosomen eher in der Kernperipherie lokalisiert waren, wobei Gruppe A eher entweder im Kopf- oder Schwanzbereich, Gruppe B eher im Mittel- oder Kopfteil lokalisiert war. Außerdem zeigten sich Chr. 1 und 3 eher an der Achse orientiert als Chr. 2. Chr. 1 wiederum zeigte sich trotz seiner Größe linearer ausgerichtet als Chr. 2 und 3. In der Gruppe B fiel ebenfalls eine eher lineare Anordnung auf, dabei zeigte sich Chr. 4 weniger achsenorientiert als Chr. 5.

Bei der Gruppe C zeigten sich die Chromosomen bevorzugt in der Kernperipherie (außer Chr. 6 und 12) sowie im Mittelteil zwischen Schwanz und Kopf. Ferner lagen sie in der Regel nicht in der Achse (außer Chr. 7 und 8) und die Chr. 6 und 9 waren stärker linear angeordnet als die anderen.

In der Gruppe D lagen die Chromosomen vornehmlich im Kernzentrum sowie im Mittelteil zwischen Kopf und Schwanz. Sie zeigten sich außerdem als nicht-axial, wobei Chr. 14 als einziges eher linear orientiert war.

In der E-Gruppe lagen die Chr. 16 und 17 eher kernzentral und im Mittel- bis Kopfbereich, während Chr. 18 eher entweder im Kopf- oder im Schwanzbereich und in der Kernperipherie vorlag. Darüber hinaus erwiesen sich die Chr. 16 und 17 im Gegensatz zu Chr. 18 als nicht-axial und nicht-linear ausgerichtet.

In der Gruppe F zeigten sich die Chromosomen eher im Kopfbereich gelegen, wobei Chr. 19 zentraler und Chr. 20 peripherer lokalisiert waren. Weiterhin war Chr. 19 eher nicht-axial und nicht-linear, während Chr. 20 eher linear und axial vorlag.

In der G-Gruppe imponierte Chr. 21 peripher, Chr. 22 dagegen zentral. Beide waren eher im Mittelteil lokalisiert. Ebenso zeigte sich Chr. 22 linearer und axialer orientiert als Chr. 21.

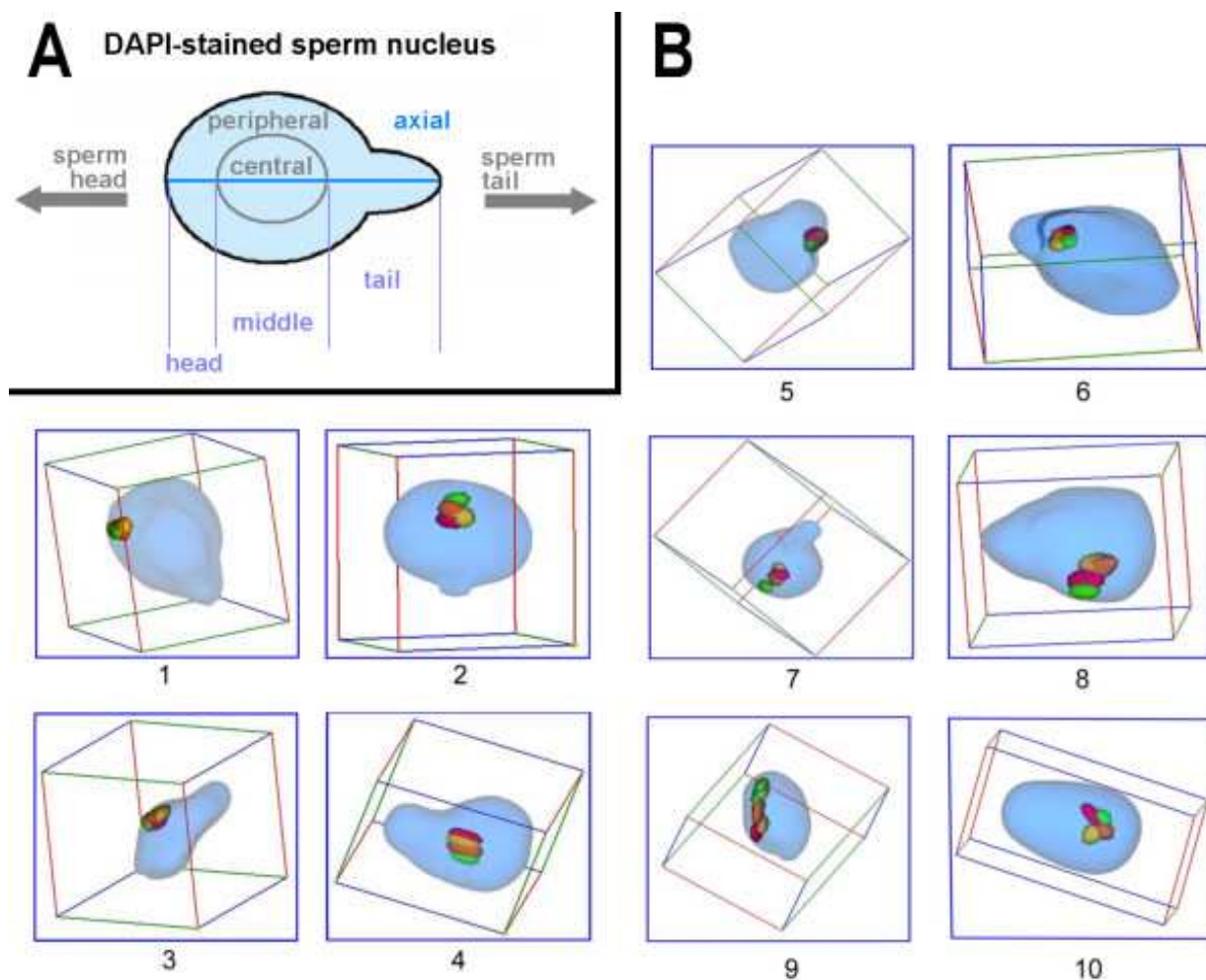


Abb. 3.9 a) Schema zu den untersuchten Parametern b) Differenzierung von Position, Beziehung zum Kernmittelpunkt und Ausrichtung der Chromosomen mit entsprechenden Beispielaufnahmen:

1. Chromosom 21 liegt in der Kernperipherie und in der Kopfregion; 2. und 4. Chromosom 8 liegt im Kernzentrum und in der Kopfregion; 3. das X-Chromosom liegt in der Kernperipherie und in der Mitte zwischen Kopf- und Schwanzregion; 5. das X-Chromosom liegt hier in der Peripherie und in der Schwanzregion; 6. das X-Chromosom liegt hier dagegen im Zentrum und in der Schwanzregion; 7. Chromosom 8 ist axial orientiert; 8. Chromosom 10 ist nicht-axial orientiert; 9. Chromosom 3 ist linear orientiert; 10. Chromosom 11 ist nicht-linear orientiert. (Manvelyan et al. 2008b)

Die Geschlechtschromosomen schließlich lagen in der Kernperipherie, wobei das X-Chromosom im Mittel- bis Schwanzteil, das Y-Chromosom eher im Mittelteil lag. Dabei waren beide eher linear angeordnet, ohne jedoch klare Präferenzen bezüglich der Kernachse zu zeigen.

Bei der Untersuchung der kernaxial gelegenen Chromosomen konnte kein eindeutiges Muster bezüglich der Ausrichtung p-/q-Arm kopf- oder schwanzwärts orientiert erkannt werden.

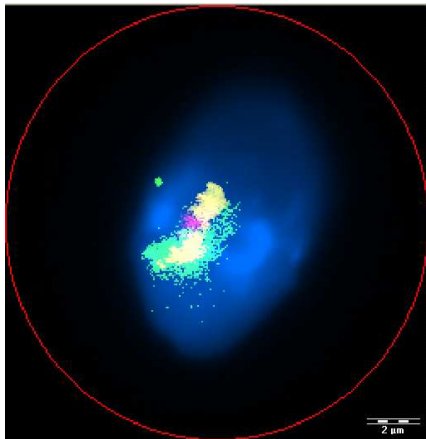


Abb. 3.10 Bildauszug aus einem Z-Stapel eines S-FISH hybridisierten Spermiums. Die verwendete Sonde ist exemplarisch die MCB X-Sonde mit oben erwähntem Markierungsschema. Zu erkennen sind die Banden in SpectrumOrange (orangerot), TexasRed (magenta), Biotin/Cy5 (gelb) und SpectrumGreen (grün) sowie die Kernfärbung in DAPI (blau)

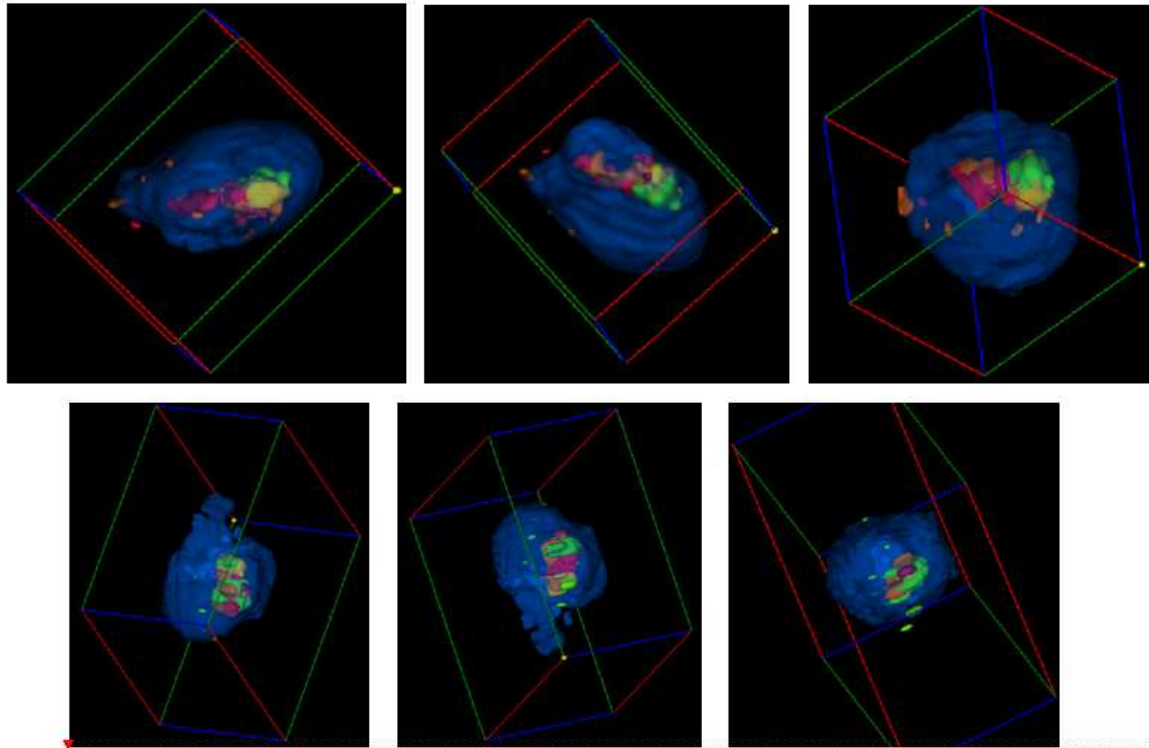
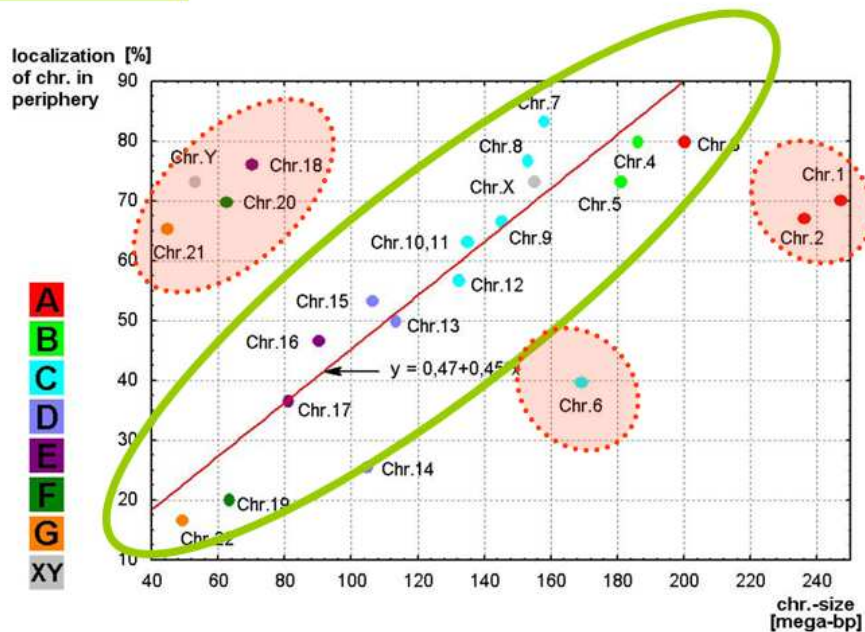


Abb. 3.11 Beispiele für 2 Kerne von S-FISH hybridisierten Spermien aus jeweils drei Positionen. Die verwendete Sonde ist ebenfalls die MCB X-Sonde mit oben erwähntem Markierungsschema. Zu erkennen sind die Banden in SpectrumOrange (orangerot), TexasRed (magenta), Biotin/Cy5 (gelb) und SpectrumGreen (grün) sowie die Kernfärbung in DAPI (blau)

Insgesamt waren die Chromosomen in den Spermien offenbar zwei Kräften unterworfen, die ihre Anordnung bedingten: der Größe der Chromosomen und ihrer Gendichte. Dazu wurden die gemessenen Werte zur Lokalisation des Chromosoms (hier als prozentualer Anteil der Kerne, bei denen das jeweilige Chromosom in der

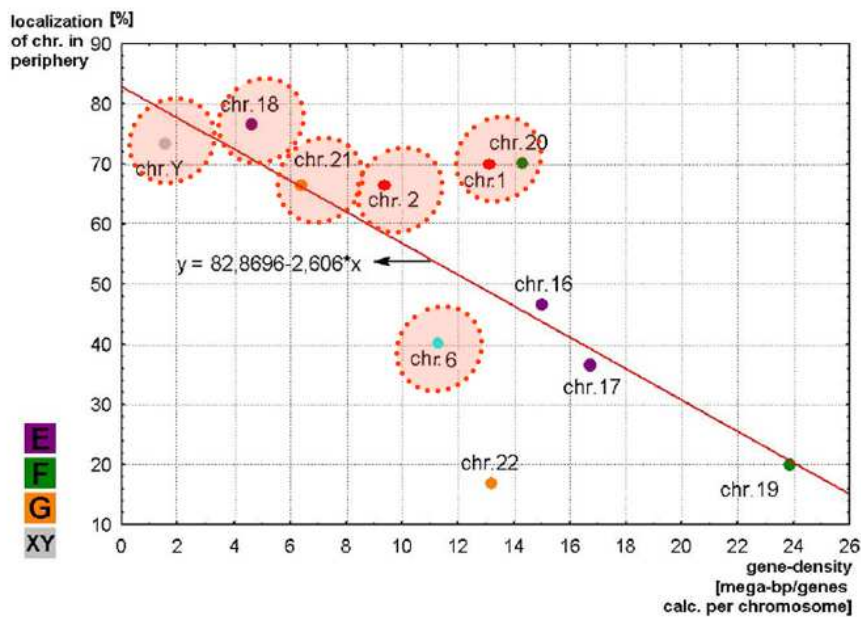
Kernperipherie lag) mit den bekannten Werten zu Größe und Gendichte ins Verhältnis gesetzt. Graphisch sind diese Zusammenhänge in Abb. 3.12 aufgeführt.

chromosome size



a)

gene density on the chromosome



b)

Abb. 3.12 Graphik zur Korrelation zwischen a) der Chromosomengröße (bzw. b) der Gendichte) und dem Anteil der Kerne, bei denen das jeweilige Chromosom in der Kernperipherie lag. Buchstaben A bis G, bzw. XY: Chr.-Gruppen; chr.-size = Chr.-Größe; bp = Basenpaare (Manvelyan et al. 2008b)



### 3.4. Weitere S-FISH-Studien an Knochenmark, zum BCR-ABL-Rearrangement und an Hirngewebe

#### 3.4.1 S-FISH-MCB-Studien an Knochenmark

Bei einem ersten Ansatz zur S-FISH-Hybridisierung auf Standard-präparierte Knochenmarkszellen konnten grundsätzlich in 4 der 10 (40%) untersuchten Kerne zufriedenstellende Hybridisierungen erreicht werden. Allerdings zeigte sich bei den komplexeren MCB-Sonden eine vergleichsweise große Unübersichtlichkeit des Kerns. So ließen sich eindeutig chromosomale Strukturen diskriminieren, in denen die jeweils verwendeten farblichen Banden identifizierbar blieben (Abb. 3.13). Jedoch stellten sich die Banden nicht so streng orthogonal zur Chromosomenachse dar, wie beispielsweise bei entsprechend bearbeiteten Lymphozyten- oder Spermienkernen.

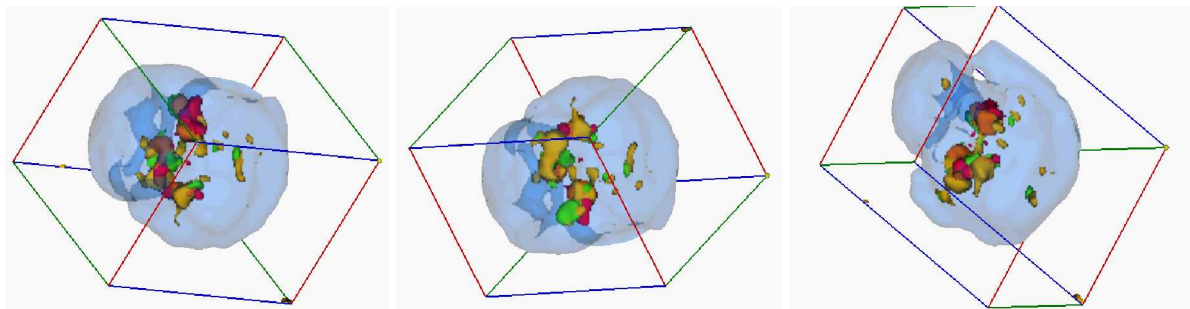
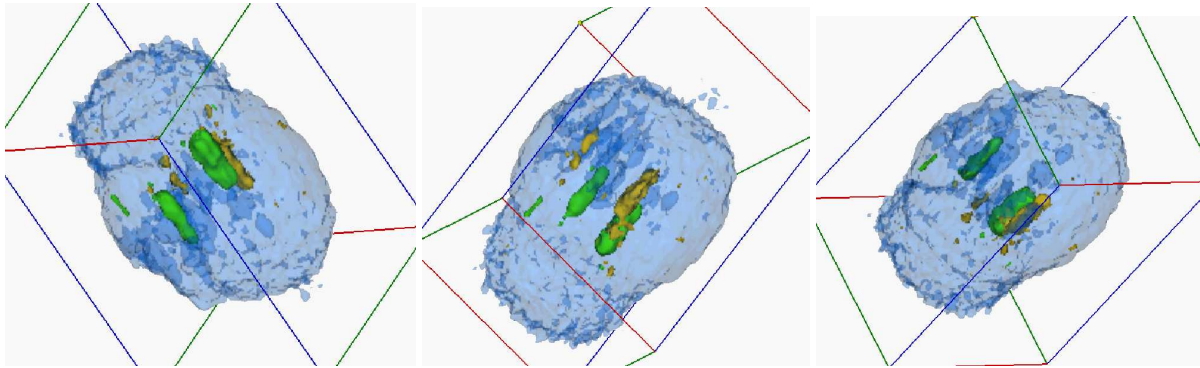


Abb. 3.13 S-FISH-MCB, hier am Beispiel eines MCB 15, an Knochenmarkszellen. Zu erkennen sind die Banden in SpectrumOrange (orangerot), TexasRed (magenta), Biotin/Cy5 (gelb) und SpectrumGreen (grün) sowie die Kernfärbung in DAPI (blau)

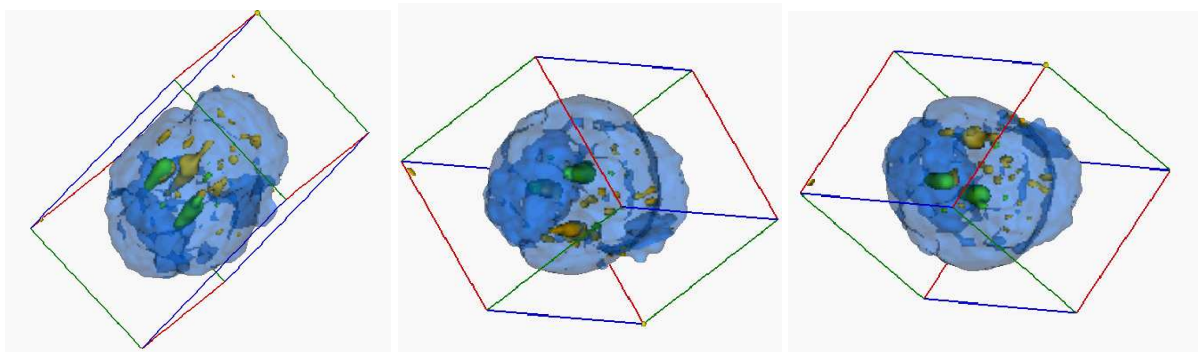
#### 3.4.2 S-FISH-Studien mittels lokusspezifischer Sonden

Die in den vorangegangenen Ergebnissen präsentierte Methode ließ sich auch mit kommerziell hergestellten Sonden wie der BCR und ABL- Sonde verwenden, um der diagnostischen Frage nach einer speziellen Translokation nachzugehen. So konnten auch bei der Anwendung der S-FISH-Technik zum Nachweis des Philadelphia-Chromosoms grundsätzlich erfolgreiche Hybridisierungen beobachtet werden.

In einem ebenfalls als Pilotversuch gedachten Ansatz mit Lymphozyten eines CML-Patienten konnte dabei bei insgesamt 26 untersuchten Kernen in 17 Fällen (65%) eine erfolgreiche Hybridisierung mit deutlicher Darstellung der reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 ( t(9;22)(q34;q11) ) erfolgen (Abb. 3.14).



a)



b)

Abb. 3.14 Beispiele für 2 Kerne von S-FISH hybridisierten Lymphozyten eines CML-Patienten aus jeweils drei Positionen. Gefärbt sind jeweils die Gene BCR in SpectrumGreen (grün) und ABL in Biotin/Cy5 (gelb). Deutlich zu erkennen ist die für das Philadelphia-Chromosom charakteristische Zusammenlagerung der zwei Signale.

### 3.4.3 S-FISH-MCB-Studien an Hirngewebe

Auch speziell präpariertes Hirngewebe wurde im Rahmen der S-FISH-MCB untersucht. In diesem, als einem reinen Pilotversuch zur Frage der grundsätzlichen Durchführbarkeit gedachten, Experiment wurden in insgesamt drei verschiedenen Ansätzen lediglich einzelne (4 bis 5) Kerne ausgewertet. Zwar konnten eindeutige Signale beobachtet werden, die für ein klares Hybridisierungsergebnis sprechen, jedoch zeigte sich diese Verfahren als äußerst anfällig für Artefakte. Ferner gelang eine Identifizierung der einzelnen Banden voneinander nur teilweise (Abb. 3.15).



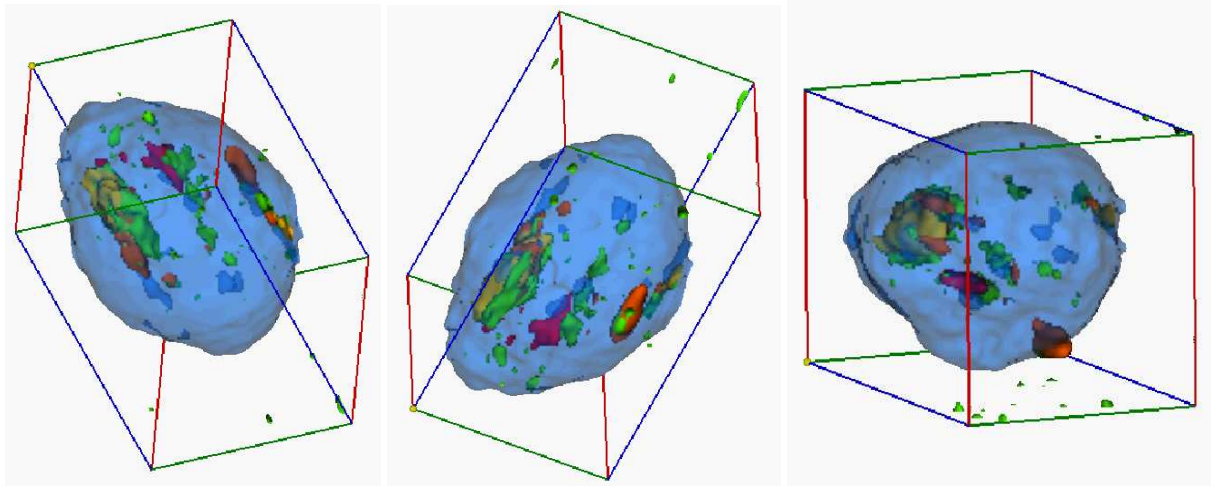


Abb. 3.15 S-FISH-MCB, hier am Beispiel eines MCB 18 an Hirngewebe. Deutlich erkennbar sind neben zwei chromosomalen Strukturen die multiplen Artefaktssignale, die am ehesten auf starke Ablagerungsbelastung zurückzuführen sind. Zu erkennen sind die Banden in SpectrumOrange (orangerot), TexasRed (magenta), Biotin/Cy5 (gelb) und SpectrumGreen (grün) sowie die Kernfärbung in DAPI (blau)

## 4. Diskussion

### 4.1 Optimierung der S-FISH Methode und Kombination mit MCB

Die grundlegende Entwicklung dieser Methode wurde bereits in einer vorangegangenen Dissertation (Steinhäuser 2007), in die auch Material aus dieser Arbeit einging, ausführlich beschrieben. Um das Verfahren kompatibel mit der MCB-Technik zu machen, bedurfte es zunächst einer Anpassung der benötigten Sonden- und Cot1-DNA-Menge. Unter Verwendung dieser Materialien im Überschuss konnten dabei die besten Hybridisierungsergebnisse erzielt werden. Allerdings vergrößerten sich damit auch der materielle und schließlich auch der finanzielle Aufwand beträchtlich. Schwachpunkt blieb die nach wie vor nicht zufriedenstellende Abschätzbarkeit der tatsächlich verwendeten Zellmenge innerhalb der Suspension, die zusätzlich durch zum Teil massive Verluste in den Zentrifugationsschritten starken Fluktuationen unterlag.

Diese Defizite im Detail sind sicherlich für die Zukunft noch zu beheben bzw. zu optimieren, ebenso wie die Tatsache, dass nach wie vor eine gewisse Menge an Sondenmaterial, trotz Waschung, im Kern verbleibt und teilweise als massive Artefaktbelastung imponiert.

Einen deutlich positiven Effekt auf die Signale hatte eindeutig die Integration einer Mikrowellenbehandlung der Kerne unmittelbar nach Zugabe der Sonde vor der eigentlichen Hybridisierung. Die bessere Signalausbeute ließ sich am ehesten durch die verbesserte Permeabilität der Kernmembran bei Hybridisierung und Waschung und die schonendere schrittweise Erwärmung des Materials erklären.

Unklar blieb der Umstand, dass bei Kernen, in deren Präparation am Ende der Kultivierung vollständig auf den Einsatz von Colchizin und Ethidiumbromid verzichtet worden war, deutlich bessere Hybridisierungsergebnisse auftraten. Eine rein hypothetisch mögliche Erklärung dafür ist, dass Colchizin, das ja den Spindelapparat alteriert, auch die gesamte Integrität des Zellkernes angegriffen und damit für die Hybridisierung tendenziell ungeeignet gemacht hat.

Nicht behebbar war weiterhin das Problem, dass der in den Sonden der konventionellen FISH gut etablierte Fluoreszenzfarbstoff Diethylaminocumarin (DEAC) sich in keinem Versuchsansatz in S-FISH als Signal darstellte. Im konkreten Fall des X-Chromosoms ließ sich dies noch kompensieren, indem im auf vier Farben beschränkten modifizierten Markierungsschema trotzdem das komplette Chromosom

abgedeckt wurde. Ähnliches gelang bei den Untersuchungen des Spermienmaterials. Für komplexere, größere Chromosomen oder unter anderen Fragestellungen würde dies aber ein Hindernis darstellen. Eine mögliche Option für die Zukunft wären daher entweder Versuchsreihen mit größeren Mengen an DEAC oder, bei Misserfolg, die Anwendung eines neuen Farbstoffs mit annähernd entsprechendem Emissionsmaximum (480 nm).

Für die Aufnahme der Zellkerne in Form von Stapeln in der Z-Ebene und die abschließende digitale Verarbeitung eignete sich grundsätzlich die verwendete CellP®-Software von Soft Imaging System GmbH, Münster. Für die Erhebung von Messwerten bot diese die Berechnung einzelner Koordinaten aber auch von Entfernungen als Vektoren im dreidimensionalen Raum an. Ein Defizit bei dieser Software lag jedoch in der Tatsache, dass eine exakte Volumenberechnung einzelner Signalbereiche nicht möglich war, und auf Behelfsmaße wie Länge und Breite zurückgegriffen werden musste. Als ein Ausblick wäre ferner auch eine Rechentechnik, die eine Darstellung MCB-hybridisierter Kerne in einem Falschfarbenmuster ähnlich wie bei der herkömmlichen MCB ermöglicht, anzustreben (vgl. Abb. 1.2).

Insgesamt waren nach wie vor der bei der praktischen Ausführung, vor allen Dingen aber bei der digitalen Nachbearbeitung, extrem hohe zeitliche und auch materielle Aufwand dieses Verfahrens problematisch. Ein Einsatz bedürfte im Rahmen einer ökonomischen Arbeit einer genauen Rechtfertigung und kann deshalb momentan zu Routinezwecken wohl nur im Bereich der Forschung eingesetzt werden.

Anzustreben für die Zukunft ist sicherlich ein Ansatz im S-FISH-Verfahren, in dem sämtliche Chromosomen farblich sichtbar gemacht sind. Analog zum in der Einleitung genannten multitude-Multicolor-Banding könnten, bei entsprechend entwickeltem SONDENSATZ und einer angepassten Falschfarbencodierung, erstmals Eindrücke der dreidimensionalen Struktur aller Chromosomen in einem nativ präparierten, sphärischen Interphasekern und exakte Erkenntnisse zur tatsächlichen Kernarchitektur erreicht werden. Bei der Analyse der Positionen der chromosomalen Strukturen untereinander würden sich so zum Beispiel Möglichkeiten zur Untersuchung der Pathogenese von Translokationen und assoziierten Krankheitsbildern ergeben.

In einem Ausblick ist die DFC-Technologie als vielversprechendes neues Verfahren zu erwähnen. Sie könnte das Generieren noch präziserer dreidimensionaler Bilder ermöglichen. Nach entsprechender digitaler Verarbeitung könnte man so zu einer noch genaueren Analyse der Oberflächenstruktur der einzelnen Signale, frei von möglichen Überlagerungsartefakten, in der Lage sein. Voraussetzung für eine langfristige Etablierung dieses Ansatzes sind jedoch der Ausbau der zur Zeit noch mangelnden digitalen Technik und die Entwicklung eines geeigneten Mediums, in dem sich die Kerne im elektrischen Feld fixieren lassen, ohne dass die Qualität der Signale merklich leidet.

## 4. 2 Studien zur X-Inaktivierung an Lymphozyten

### 4.2.1 Zweidimensionale Studien an MCB-gefärbten X-Chromosomen

In der Tendenz konnten die erzielten Ergebnisse einer vergleichsweise großen Menge untersuchter Lymphozytenkerne bestätigen, dass grundsätzlich die chromosomale Struktur der Metaphase auch im Interphasekern erhalten bleibt, wie bereits in früheren Arbeiten angedeutet (Lemke et al. 2002). Die Dekondensierung der Chromosomen bevorzugt orthogonal zur Chromosomenachse bei gleichzeitig weitgehend intaktem Bandenmuster konnte ebenfalls größtenteils bestätigt werden. Allerdings zeigten sich bei der kritischen Betrachtung der äußerst geringen Ausbeute an beurteilbaren Kernen schnell die Grenzen dieser zweidimensionalen Methode. Verursacht wurden derartige Artefakte vermutlich, wie bereits in der Literatur beschrieben, durch den Prozess des Auftropfens und präparationsbedingte Schwellungen (Claussen et al. 2002). Aus diesem Grund wurden keine Daten zur Positionsbestimmung im Kern erhoben, da angenommen werden konnte, dass diese durch das Tropfen vollkommen verschoben worden wären.

Der aus den schließlich vermessenen Kernen hervorgehende Quotient  $X_{\text{lang}}/X_{\text{kurz}}$  von 1,34 beim Längenvergleich zeigte zumindest eine Tendenz. Es deutete sich damit an, dass offenbar tatsächlich in einem Kern fast durchgehend je ein eindeutig größeres und ein kleineres X-Chromosom vorlagen, da lediglich bei nur sehr wenigen Kernen kein eindeutiger Größenunterschied beobachtet wurde. Trotzdem sollten auch diese Fälle bei der Beurteilung dahingehend berücksichtigt werden, dass eine absolute Eindeutigkeit offenbar nicht erreichbar war.

Die erhobenen Messergebnisse waren allerdings in mehrerlei Hinsicht kritisch zu bewerten. Die oben diskutierten Tropfartefakte könnten eine Verschiebung der Größenverhältnisse bewirkt haben. Basierend auf den Arbeiten von Steinhäuser et al. 2002 musste man ferner davon ausgehen, dass Quellungsprozesse im Verlauf der Präparation das Volumen des Kernes stark verändern. Folglich blieb es fraglich, ob die gemessenen Größen den nativen Verhältnissen in vivo entsprachen. Der Umstand allerdings, dass der erstellte Quotient  $X_{\text{lang}}/X_{\text{kurz}}$  annähernd dem in den folgenden Versuchen mit dreidimensionalen Kernen glich, könnte unter Umständen andeuten, dass durch Quellartefakte zwar der Kern nicht mehr nativ vorlag, die Chromosomen darin aber in tendenziell gleichbleibenden Relationen vorlagen.

Ferner blieb zu hinterfragen, ob die Länge allein ein valides Maß zur Differenzierung des aktiven vom inaktiven Chromosom war, und ob nicht andere zum Teil bereits beschriebene Faktoren wie die Oberflächenstruktur und Ausdehnung, die bereits vor einigen Jahren in die Diskussion eingebracht worden waren ((Eils et al. 1996) bzw. (Cremer et al. 2006)) oder weitere, wie die Position im nativ sphärisch konservierten dreidimensionalen Raum, von größerer Relevanz waren.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass diese als Vorversuch gedachten Beobachtungen zwar gewisse Tendenzen aufwiesen, und sich in ihnen die Methode MCB als äußerst nützlich für derartige Fragestellungen erwies, in erster Linie jedoch hinführen sollten zu Untersuchungen am dreidimensionalen Kern.

#### 4.2.2 Dreidimensionale Studien an MCB-gefärbten X-Chromosomen

In diesen Studien sollte zusätzlich zu den Fragen der Größe geklärt werden, welche Rolle die periphere bzw. zentrale Position bei der Differenzierung des inaktiven vom aktiven Chromosom spielt. Dies geschah analog zu den Erkenntnissen, dass bei den Autosomen die genreichen, transkriptorisch aktiven Chromosomen eher kernzentraler vorliegen als die genarmen, inaktiven (Croft et al. 1999; Boyle et al. 2001; Cremer et al. 2001). Konkret stellten sich also die Fragen, ob das inaktive Chromosom kleiner und weniger in seiner Oberfläche ausgedehnt war, peripherer lag, und ob sich dies mit reinen MCB-S-FISH-Untersuchungen erfassen ließ, oder ob es einer Klärung mittels XIST-RNA-FISH bedurfte.

Dieser erstmalige Ansatz einer MCB-FISH im S-FISH-Verfahren mit entsprechender optischer Darstellung und ausführlicher digitaler Verarbeitung und Vermessung konnte zunächst grundsätzlich als erfolgreich bezeichnet werden. Eine bessere

Ausbeute an analysierbaren Kernen war zu diesem Zeitpunkt nicht zu erreichen, könnte jedoch durch eine verbesserte Software oder breit angelegte Versuchsreihen zur Optimierung der Waschschriffe sicherlich zumindest teilweise langfristig möglich gemacht werden. Die Ausschöpfung übertraf dabei jedoch immer noch die aus den zweidimensionalen Versuchsansätzen.

Darüber hinaus ließ sich eindeutig bestätigen, dass auch in der 3D-Analyse das MCB-Muster und damit die chromosomale Intaktheit beim aktiven wie auch beim inaktivierten X-Chromosom eine Persistenz zeigte, wie von Lemke beschrieben (Lemke et al. 2002).

Offen blieb weiterhin die Frage nach dem Grund für die erwähnte Beobachtung, dass durchgehend in so zahlreichen Kernen auch bei sonst sehr guten Hybridisierungsergebnissen die Telomerbereiche nur abgeschwächte bis gar keine Signale sichtbar wurden.

Die aufgeführten Daten zur Lage im Kern im Verhältnis zum Kernmittelpunkt sowie zu den Maßen von Länge und Breite wurden ermittelt, um weitere Anhaltspunkte bei der Differenzierung des aktiven vom inaktiven X-Chromosoms zu erhalten. Aus dem Umstand, dass sich im Laufe der Untersuchungen ein relativ großer Anteil bot, bei dem sich Unterschiede in der Verteilung von Länge und Breite (also beispielsweise das periphere X-Chromosom länger, dafür aber das zentrale breiter) zeigten, ergab sich die Bedeutung des Produktes aus Länge und Breite als Näherung für die Oberflächenausdehnung und damit für eine Art „Gesamtgröße“ des Chromosoms. Länge und Breite wurden aber trotz phasenweise mangelhafter Eindeutigkeit weiterhin als Werte mit in diese Diskussion eingeschlossen.

Aus den Messungen ergab sich zunächst einmal, bestätigend zu den Resultaten aus 3.2.1, dass auch im dreidimensionalen Kern die X-Chromosomen grundsätzlich nicht gleich groß, also weder gleich lang noch (mit Ausnahmen s. 3.2.2) gleich breit waren. Auch in der Ausdehnung ließen sich eindeutig jeweils ein größeres und ein kleineres X-Chromosom diskriminieren. Die zum Vergleich erstellten Quotienten bei der Länge  $X_{\text{lang}}/X_{\text{kurz}}$  von 1,35 sowie bei der Breite  $X_{\text{breit}}/X_{\text{schmal}}$  von 1,37 konnten sogar in der Richtung die Resultate der Messungen am zweidimensionalen Kern untermauern.

Ferner ließ sich bei der Betrachtung der Position der Chromosomen zum Kernmittelpunkt feststellen, dass offenbar grundsätzlich jeweils ein Chromosom eher in der Peripherie des Kerns lokalisiert war, während das andere eher in der Nähe des Kernmittelpunkts vorlag. Kritisch zu betrachten war bei sämtlichen

Schlussfolgerungen aus dieser Position zum Kernmittelpunkt jedoch immer der Umstand, dass der Anhaltspunkt für die Position des Gesamtchromosoms willkürlich - in Ermangelung eines eindeutigen Parameters gewählt - das Zentromer war. Dies berücksichtigte demnach nicht die kontrovers diskutierten Theorien der nach wie vor ungeklärten Gesamtarchitektur des Zellkerns bezüglich der Zentromerenposition ((Chaly and Brown 1988), bzw. (Weierich et al. 2003)).

Bei der Zusammenführung dieser Daten unter der Fragestellung, ob es Zusammenhänge zwischen der Lage und der Größe der beiden X-Chromosomen mit möglichen Hinweisen auf deren Aktivitätsstatus gibt, konnten allerdings nicht ganz eindeutige Ergebnisse erzielt werden. Die eingangs genannten Theorien und Arbeiten besagen einerseits, dass das transkriptionell aktive X-Chromosom eine größere Oberfläche aufzeigt (Eils et al. 1996), und dass zum anderen die genreichen, also aktiven Genregionen bzw. Chromosomen eher im Kernmittelpunkt vorzufinden sind (Croft et al. 1999; Boyle et al. 2001; Cremer et al. 2001). Folglich hätte das jeweils in Länge, Breite und Oberflächenausdehnung als „größer“ gemessene X-Chromosom immer einen geringeren Abstand zum Kernmittelpunkt aufweisen müssen. Dies war jedoch nicht in der erwarteten Eindeutigkeit feststellbar. Zwar ließ sich erkennen, dass durchgehend beim Vergleich der Breite, der Ausdehnung und vor allen Dingen der Länge in der Gewichtung das jeweils zentral lokalisierte Chromosom in der Mehrheit der Kerne „größer“ war, diese Mehrheit jedoch nicht so klar wie erwartet imponierte.

Diese Ergebnisse waren also zunächst als Tendenzen zu bewerten. Untermauert werden konnten diese Tendenzen bei einem differenzierteren Blick auf die Ergebnisse in Abb. 3.6.d): Betrachtete man lediglich die Kerne, bei denen Länge und Breite (und damit natürlich auch die Ausdehnung) beide beim zentral gelegenen X-Chromosom größer waren, erhielt man davon einen Anteil von 30,4% im Vergleich zu 21,7% für die Konstellationen, bei denen dies für das periphere Chromosom galt.

Es bot sich an, auch eine quantitative Untersuchung des Verhältnisses von Größe und Abstand der beiden X-Chromosomen zu unternehmen. Wie im Anhang (Abb. 6.2 und 6.3) zu sehen, ergaben sich jedoch keine linearen Abhängigkeiten der Werte voneinander. Begründen ließ sich dies möglicherweise mit der Lyon-Hypothese (Lyon 1961), die ja unter anderem besagt, dass immer ein X-Chromosom aktiv ist, das andere nicht. Auch wenn neuere Arbeiten mittlerweile geringfügige Ausnahmen von dieser Regel ausmachen konnten (Payer und Lee 2008), war folglich Aktivität in

diesem konkreten Fall der X-Chromosomen als absoluter Wert zu interpretieren, bei dem nicht das eine Chromosom „aktiver“ relativ zum anderen erschien.

Zusammenfassend ließ sich dieses erste breit angelegte Experiment mit Kombination aus MCB-Technik und S-FISH unter einer konkreten Fragestellung durchaus als erfolgreich bezeichnen. Die erhobenen Ergebnisse stellten in jedem Fall wertvolle Tendenzen dar, die eine eindeutige Antwort auf die Fragestellung jedoch nur bedingt ermöglichten.

Bei der Anstrengung eines klareren Ergebnisses musste auf eine weitere Technik zurückgegriffen werden – einen S-FISH-Versuch mit einer XIST-Sonde, die das inaktive Chromosom eindeutig identifiziert.

#### 4.2.3 Dreidimensionale Studien mit RNA-XIST-Sonde

Die Vorversuche mit XIST-Sonden als erstem Versuch einer RNA-FISH im S-FISH-Verfahren waren erfolgreich und konnten so als ein weiteres, zwar weniger effizientes aber doch mögliches Anwendungsgebiet der S-FISH angesehen werden. Ebenso waren sicherlich auch die gelungenen Hybridisierungen in der kombinierten RNA- /DNA-FISH grundsätzlich positiv zu bewerten. Es fiel jedoch die geringe Ausbeute an verwertbaren Kernen auf, die noch hinter der aus den einfachen DNA-S-FISH-Ansätzen zurückblieb. Begründet waren derartige Resultate vermutlich im in 2.3.3 bzw. 3.2.3 erwähnten Kompromiss bei der Denaturierung. Diese war für eine DNA-FISH zwingend notwendig, für eine RNA-FISH eher hinderlich. Unter diesen, entsprechend vor allen Dingen für die anfällige RNA-FISH schädlichen, Bedingungen konnte folglich bei einem Großteil der Kerne kein XIST-Signal gefunden werden. Ferner wird RNA, auch in konventionellen FISH-Ansätzen, immer als äußerst instabil beschrieben (Lawrence et al. 1989), wobei ein protektiver Effekt des intakten Kerns bei S-FISH als in dieser Hinsicht schonenderem Verfahren, sicherlich diskutiert werden kann.

Bei den trotz geringerer Anzahl untersuchter Kerne erhobenen Messwerten ließen sich dennoch entsprechende Schlüsse ziehen. Aus Abb. 3.8 geht klar hervor, dass das aktive Chromosom in einer gewissen Mehrheit der Kerne als „größer“ unter sämtlichen Gesichtspunkten bei der Frage der Größe (Breite 75% der Kerne, Länge 70% oder Oberflächenausdehnung 77,8%) imponierte, während die Kerne, bei denen sich das inaktive Chromosom größer darstellte, eher in der Minderheit waren.



Noch etwas klarer stellte sich die Situation bei der Betrachtung der Position dar. In 80% der Kerne lag das als aktiv identifizierte X-Chromosom deutlich kernzentraler als das als inaktiv markierte.

Die in Anlehnung an die Untersuchungen unter 3.2.1 und 3.2.2 erhobenen Quotienten zum quantitativen Vergleich der Längen und Breiten  $\text{Breite } X_{\text{aktiv}}/\text{Breite } X_{\text{inaktiv}}$  von 1,38 bzw.  $\text{Länge } X_{\text{aktiv}}/\text{Länge } X_{\text{inaktiv}}$  von 2,0 belegten nicht nur, dass im Mittel ein Chromosom, nämlich das aktive Chromosom „größer“ (länger, bzw. breiter) als das andere war, sie bestätigten auch in der Richtung die Schlüsse aus 4.2.1 und 4.2.2. Dies gilt zumindest im Hinblick auf die Quotienten beim Vergleich der Breite - bei der Länge waren hier möglicherweise Abstriche zu machen, da ja mit der Vermessung von nur zwei Banden lediglich ein Ausschnitt aus dem gesamten Chromosom vorlag.

Es konnten also die Tendenzen aus den Versuchen unter 4.2.2 und 4.2.1 in ihrer Richtung bestätigt werden. Dies bedeutete, dass das jeweils aktive X-Chromosom eine bevorzugt kernzentrale Position im Kern innehatte, und tendenziell eher eine stärkere Oberflächenausdehnung aufwies. Quantitative Abhängigkeiten ergaben sich auch hier nicht (s. Abb. 6.2 und 6.3 im Anhang); mögliche Erklärungen dafür sind unter 4.2.2 genannt. Der kernzentralen Position musste hierbei aber wohl eine höhere Gewichtung als der Frage der Größen- oder Oberflächenausdehnung beigemessen werden. Festgestellt werden musste allerdings auch, dass diese Schlüsse nach wie vor lediglich als Tendenzen wahrgenommen werden konnten, die auch andere Konstellationen zuließen. Ebenfalls konnten klar die Grenzen dieser Methode aufgezeigt werden. So war zusätzlich zu den Angaben unter 4.1 der zeitliche Aufwand von Präparation Hybridisierung und Waschung, vor allen Dingen aber der bei der Aufnahme von Z-Stapeln mit der Kamera und der digitalen Verarbeitung und Vermessung, der pro Kern zahlreiche Stunden in Anspruch nahm, als ein Schwachpunkt zu nennen. Dies fiel gerade unter dem Aspekt, dass im Vergleich zur reinen DNA-S-FISH hierbei nur ein Bruchteil der schließlich dargestellten Kerne auch tatsächlich ein auswertbares Hybridisierungsergebnis zeigte, schwer ins Gewicht. Als ein weiteres Defizit war auch hier die nach wie vor fehlende technische Möglichkeit der exakten digitalen Analyse von Oberfläche und Volumen der chromosomalen Strukturen oder deren Ausschnitte zu nennen. Demnach waren sämtlich Daten zur „Größe“ und Ausdehnung nur als Näherungen zu bewerten.

#### 4.3 S-FISH-MCB-Studien an Spermien

Diese erstmaligen Versuche mit MCB kombiniert mit S-FISH an menschlichen Spermien sind, auch dank der außergewöhnlich hohen Ausbeute, als überaus erfolgreich zu bewerten.

Bei der Betrachtung der jeweiligen Größe der Chromosomen (in Megabasenpaaren) ließ sich - außer bei den Chromosomen #1, #2, #6, #14, #18, #20, #21 und Y – grundsätzlich feststellen, dass ein Zusammenhang zwischen Größe und Lage bestand. Dieser Zusammenhang zeigte, dass größere Chromosomen eher kernperipher, kleinere eher kernzentral lagen.

Betrachtete man ferner gesondert die kleineren Chromosomen (Gruppen E, F, G sowie das Y-Chromosom), ergab sich eine stärkere Abhängigkeit der Lage von der Gendichte. Chromosomen mit höherer Gendichte fanden sich demnach verstärkt im Zentrum des Kerns. Dieser Zusammenhang war bei den Gruppen mit den größeren Chromosomen weniger deutlich. Die detaillierte Diskussion findet sich unter (Manvelyan et al. 2008b).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Positionierung der Chromosomen im Spermienkern durchaus einer Systematik unterlagen und ferner, dass sowohl die Größe des Chromosoms, als auch die Gendichte darin Einflüsse auf die Positionierung zu haben schienen. Dies deckte sich mit einzelnen bekannten Erkenntnissen aus zweidimensionalen Spermien aber auch Lymphozyten (Weierich et al. 2003). Eine Sonderrolle nahmen dabei wohl die akrozentrischen Chromosomen ein (Manvelyan et al. 2008a).

Insgesamt erwiesen sich die Spermien als ein weiteres dankbares Material für die kombinierte Anwendung von MCB und S-FISH unter einer konkreten Fragestellung.

Diese Untersuchungen lieferten die ersten ausführlichen Ergebnisse zur dreidimensionalen Kernarchitektur von Spermienzellen. In der Zukunft bieten sich darauf aufbauende Studien beispielsweise an Spermienmaterial von Infertilitätspatienten an, um möglicherweise neue Mechanismen und Erklärungen für die Infertilität zu erfassen.

#### 4.4 Weitere S-FISH-Studien an Knochenmark, zum BCR-ABL-Rearrangement und an Hirngewebe

##### 4.4.1 S-FISH-MCB-Studien an Knochenmark

Auch für die verwendeten Knochenmarkszellen gelang es grundsätzlich, das MCB-S-FISH-Verfahren in ausreichender Effizienz anzuwenden. Die Rekonstruierbarkeit der Bandenabfolge erwies sich allerdings als nur mäßig. Problem dabei war die im Ergebnisteil angedeutete Unübersichtlichkeit des Kerns. Eine mögliche Verwertbarkeit des Verfahrens beispielsweise bei Fragestellungen zu diversen hämatologischen Erkrankungen ergab sich trotzdem als Ausblick für die Zukunft, möglicherweise noch aussagekräftiger, wenn eine geeignete Rechentechnik zur Falschfarbenrekonstruktion analog zum konventionellen MCB etabliert ist (vgl. Abb. 1.2). Ein Zusammenhang bei der AML zwischen der Konstellation der Chromosomen in der Interphase und der Erkrankung konnte so bereits mit eben diesem Verfahren erkannt werden. (Manvelyan et al. 2009)

##### 4.4.2 S-FISH-Studien mittels lokusspezifischer Sonden

Der Versuchsansatz von peripheren Blutlymphozyten eines CML-Patienten in einer S-FISH-Hybridisierung mit BCR- und ABL-Sonden gelang ebenfalls, wohl dank des weniger komplexen kommerziellen Sondenmaterials mit überdurchschnittlich hohem Anteil an zufriedenstellenden Signalergebnissen. Somit wurde ein erstes Beispiel für die Anwendung der S-FISH bei diagnostischen Fragestellungen in krankhaft verändertem Gewebe ermöglicht. Aus diesen Pilotversuchen ergab sich für die Zukunft die Möglichkeit für weit angelegtere Versuche und Patientenstudien. Da, wie unter den Punkten 4.2 und 4.3 gezeigt, die technischen Möglichkeiten zu exakten Abstandsmessungen im dreidimensionalen Raum bereits gegeben sind, bieten sich beispielsweise für spätere Experimente Untersuchungen zur Pathogenese des Philadelphia-Chromosoms an.

##### 4.4.3 S-FISH-MCB-Studien an Hirngewebe

Grundsätzlich resultierten auch die Versuchsansätze mit präpariertem Hirngewebe im MCB-S-FISH-Verfahren in zufriedenstellenden Signalen. Dabei ließen sich die Chromosomen im Vergleich zu denen in den Spermien- und Blutzellen allerdings nur

begrenzt in ihrer intakten Bandenfolge rekonstruieren. Ein weiteres Problem stellten die zahlreichen Signalartefakte im Kern dar. Dies wurde bereits für die konventionelle FISH als durch Ablagerungen bedingt beschrieben (Yurov et al. 2001). Die diagnostische Verwertbarkeit war also im verwendeten ablagerungsbelasteten Hirngewebe stark eingeschränkt. Ein möglicher Einsatz in weniger belastetem Gewebe wäre allenfalls als Ausblick von Interesse.

## 4.5 Schlussfolgerungen

Orientiert an der Fragestellung wurden folgende Resultate erzielt:

1. Die S-FISH-Methodik kombiniert mit MCB sowie die kombinierte DNA/RNA-S-FISH konnten etabliert und optimiert werden für einen routinemäßigen Einsatz in der Forschung.
2. Lage und Struktur der menschlichen X-Chromosomen in peripheren Blutlymphozyten konnten an zwei- wie an dreidimensional erhaltenen Interphasekernen erfasst werden. Unterschiede in Größe und Ausdehnung der Chromosomenterritorien ließen sich nachweisen, welche in Übereinstimmung mit der Lyon-Hypothese stehen.
3. In der Frage der Interphasekernstruktur menschlicher Spermien konnten erstmalig umfassend diverse Parameter die chromosomale Lage im Kern betreffend untersucht und erfasst werden. Es zeigte sich dabei, dass sowohl die Größe als auch die Gendichte der Chromosomen diese Parameter mitbestimmten. Es ließen sich deutliche Analogien zu Lymphozyten und anderen Geweben herstellen.
4. Gewebe wie maligne Lymphozyten, Gehirn und Knochenmark konnten prinzipiell mittels MCB-S-FISH analysiert werden. Für die Zukunft bieten sich noch Weiterentwicklungen auf dem Gebiet des effizienteren Materialeinsatzes sowie der optischen und digitalen Weiterverarbeitung.

Zur grundlegenden Frage nach der Beschaffenheit der Interphasekernstruktur menschlicher Zellen konnten in dieser Arbeit wichtige Anhaltspunkte gewonnen werden. Es gelang die Bestätigung der Ideen, nach denen transkriptorisch aktive Chromosomen in Lymphozyten eher im Kernmittelpunkt vorzufinden sein sollen, sowie der Nachweis zweier „driving forces“ für die Anordnung von Chromosomen in der transkriptorisch inaktiven Interphase entsprechend Größe und Gendichte.

## 5. Literatur

<http://www.medizinische-genetik.de/typo3temp/pics/c9dd25cae4.gif>

Afzelius B. 1959. Electron microscopy of the sperm tail; results obtained with a new fixative. J Biophys Biochem Cytol 5(2): 269-78.

Anahory T, Hamamah S, Andréo B, Hédon B, Claustres M, Sarda P, Pellestor F. 2005. Sperm segregation analysis of a (13;22) Robertsonian translocation carrier by FISH: a comparison of locus-specific probe and whole chromosome painting. Hum Reprod 20(7): 1850-4.

Arnold J. (1879). Über feinere Strukturen der Zelle unter normalen und pathologischen Bedingungen. Virchows arch path Anat 77: 181-206

Arnoldus EP, Noordermeer IA, Peters AC, Raap AK, Van der Ploeg M. 1991. Interphase cytogenetics reveals somatic pairing of chromosome 17 centromeres in normal human brain tissue, but no trisomy 7 or sex-chromosome loss. Cytogenet Cell Genet 56(3-4): 214-6.

Arnoldus EP, Peters AC, Bots GT, Raap AK, van der Ploeg M. 1989. Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum. Hum Genet 83(3): 231-4.

Arrighi FE, Hsu TC. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics 10(2): 81-6.

Aurich-Costa J, Vannier A, Grégoire E, Nowak F, Cherif D. 2001. IPM-FISH, a new M-FISH approach using IRS-PCR painting probes: application to the analysis of seven human prostate cell lines. Genes Chromosomes Cancer 30(2): 143-60.

Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J Exp Med 149(2): 297-326.

Barr ML, Bertram EG. 1949. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature 163(4148): 676.

Bloom SE, Goodpasture C. 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. Hum Genet 34(2): 199-206.

Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Müller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. PLoS Biol 3(5): e157.

Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, Grompe M, Pizzuti A, Muzny D, Lawrence C. 1991. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. Nature 351(6324): 325-9.

Boveri T. 1909. Der Blastomerenkern von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. Arch Exp Zellforschung 3: 181-268

Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA. 2001. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. Hum Mol Genet 10(3): 211-9.

Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, Cooper P, Smith S, McCabe VM, Norris DP, Penny GD, Patel D, Rastan S. 1991. Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. Nature 351(6324): 329-31.

Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF. 1991. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature 349(6304): 38-44.

Brown R. 1810. *Prodromus florae Novae Hollandiae et insulae Van Diemen* (Facs.), New York: Hafner

Caspersson T., Faber S., Foley G.E., Kudnyowsky J., Modest E., Wagh V., Zech L. (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Exp Cell Res 49: 219-222

Caspersson T, Zech L, Johansson C. 1970. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. Exp Cell Res 62(2): 490-2.

Chaly N, Brown DL. 1988. The prometaphase configuration and chromosome order in early mitosis. J Cell Sci 91 ( Pt 3): 325-35.

Chang SS, Mark HF. 1997. Emerging molecular cytogenetic technologies. Cytobios 90(360): 7-22.

Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. 1999. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. Cytogenet Cell Genet 84(3-4): 156-60.

Claussen U, Michel S, Mühlig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T. 2002. Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. Cytogenet Genome Res 98(2-3): 136-46.

Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB. 1996. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. J Cell Biol 132(3): 259-75.

Comings DE. 1968. The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. Am J Hum Genet 20(5): 440-60.

Cornforth MN, Greulich-Bode KM, Loucas BD, Arsuaga J, Vázquez M, Sachs RK, Brückner M, Molls M, Hahnfeldt P, Hlatky L, Brenner DJ. 2002. Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells. J Cell Biol 159(2): 237-44.

Costanzi C, Pehrson JR. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. Nature 393(6685): 599-601.

Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S. 2006. Chromosome territories--a functional nuclear landscape. Curr Opin Cell Biol 18(3): 307-16.

Cremer M, Küpper K, Wagler B, Witzelmann L, von Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T. 2003. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. J Cell Biol 162(5): 809-20.

Cremer M, von Hase J, Volm T, Brero A, Kreth G, Walter J, Fischer C, Solovei I, Cremer C, Cremer T. 2001. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. Chromosome Res 9(7): 541-67.

Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. 1988. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. Hum Genet 80(3): 235-46.

Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. J Cell Biol 145(6): 1119-31.

Dutrillaux B, Lejeune J. 1971. [A new technic of analysis of the human karyotype]. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 272(20): 2638-40.

Eils R, Dietzel S, Bertin E, Schröck E, Speicher MR, Ried T, Robert-Nicoud M, Cremer C, Cremer T. 1996. Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. J Cell Biol 135(6 Pt 1): 1427-40.

Ferguson M, Ward DC. 1992. Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. Chromosoma 101(9): 557-65.

Fitzgerald PH, Adams A, Gunz FW. 1963. Chronic granulocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. Blood 21: 183-96.

Ford CE, Hamerton JL. 1956. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. Stain Technol 31(6): 247-51.



Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. 1959. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). Lancet 1(7075): 711-3.

Haaf T, Schmid M. 1991. Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. Exp Cell Res 192(2): 325-32.

He D, Brinkley BR. 1996. Structure and dynamic organization of centromeres/prekinetochores in the nucleus of mammalian cells. J Cell Sci 109 ( Pt 11): 2693-704.

Heard E, Mongelard F, Arnaud D, Chureau C, Vourc'h C, Avner P. 1999. Human XIST yeast artificial chromosome transgenes show partial X inactivation center function in mouse embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 96(12): 6841-6.

Henikoff, S. 1997. Nuclear organization and gene expression: homologous pairing and long-range interactions. Curr Opin Cell Biol 9(3): 388-95.

Hens L, Kirsch-Volders M, Verschaeve L, Susanne C. 1982. The central localization of the small and early replicating chromosomes in human diploid metaphase figures. Hum Genet 60(3): 249-56.

Hiraoka Y, Dernburg AF, Parmelee SJ, Rykowski MC, Agard DA, Sedat JW. 1993. The onset of homologous chromosome pairing during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. J Cell Biol 120(3): 591-600.

Hirsch-Kaufmann M, Schweiger M 1996. Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Dritte Auflage. Stuttgart, New York: Thieme Verlag

Hooke R. 1665. Micrographia.

Howell WM, Denton TE, Diamond JR. 1975. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. Experientia 31(2): 260-2.

Hsu TC. 1952. Mammalian chromosomes in vitro. The karyotype of man. J Hered 43 167-172.

Iourov IY, Vorsanova SG, Pellestor F, Yurov YB. 2006. Brain tissue preparations for chromosomal PRINS labeling. Methods Mol Biol 334: 123-32.

Jacobs PA. 1969. Structural abnormalities of the sex chromosomes. Br Med Bull 25(1): 94-8.

Jalal SM, Law ME, Christensen ER, Spurbeck JL, Dewald GW. 1993. Method for sequential staining of GTL-banded metaphases with fluorescent-labeled chromosome-specific paint probes. Am J Med Genet 46(1): 98-103.

Johnston CM, Nesterova TB, Formstone EJ, Newall AE, Duthie SM, Sheardown SA, Brockdorff N. 1998. Developmentally regulated Xist promoter switch mediates initiation of X inactivation. Cell 94(6): 809-17.

Lawrence JB, Singer RH, Marselle LM. 1989. Highly localized tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualized by in situ hybridization. Cell **57**(3): 493-502.

Lee C, Wevrick R, Fisher RB, Ferguson-Smith MA, Lin CC. 1997. Human centromeric DNAs. Hum Genet **100**(3-4): 291-304.

Leeuwenhoek, v. A. 1715-1722. Opera omnia.

Lehrer H, Weise A, Michel S, Starke H, Mrasek K, Heller A, Kuechler A, Claussen U, Liehr T. 2004. The hierarchically organized splitting of chromosome bands into sub-bands analyzed by multicolor banding (MCB). Cytogenet Genome Res **105**(1): 25-8.

Lejeune J, Gautier M, Lafourcade J, Bergerer R, Turpin R. 1964. [Partial Deletion of the Short Arm of the 5 Chromosome: The 5th Case of Crying Cat Syndrome.]. Ann Genet **7**: 7-10.

Lejeune J, Turpin R, Gautier M. 1959. [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy).]. Bull Acad Natl Med **143**(11-12): 256-65.

Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Mühlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt UW, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U. 2002. The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. Am J Hum Genet **71**(5): 1051-9.

Lesko SA, Callahan DE, LaVilla ME, Wang ZP, Ts'o PO. 1995. The experimental homologous and heterologous separation distance histograms for the centromeres of chromosomes 7, 11, and 17 in interphase human T-lymphocytes. Exp Cell Res **219**(2): 499-506.

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Hum Genet **80**(3): 224-34.

Liehr T, Hrsg. 2008. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) - Application Guide Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Liehr T, Grehl H, Rautenstrauss B. 1997. Molecular diagnosis of PMP22-associated neuropathies using fluorescence in situ hybridization (FISH) on archival peripheral nerve tissue preparations. Acta Neuropathol **94**(3): 266-71.

Liehr T, Heller A, Starke H, Claussen U. 2002a. FISH banding methods: applications in research and diagnostics. Expert Rev Mol Diagn **2**(3): 217-25.

Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. 2002b. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. Int J Mol Med **9**(4): 335-9.

Liehr T, Starke H, Heller A, Kosyakova N, Mrasek K, Gross M, Karst C, Steinhäuser U, Hunstig F, Fickelscher I, Kuechler A, Trifonov V, Romanenko SA, Weise A. 2006. Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding. Cytogenet Genome Res 114(3-4): 240-4.

Lyon MF. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). Nature 190: 372-3.

Manuelidis L. 1985. Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. Hum Genet 71(4): 288-93.

Manvelyan M, Hunstig F, Mrasek K, Bhatt S, Pellestor F, Weise A, Liehr T. 2008a. Position of chromosomes 18, 19, 21 and 22 in 3D-preserved interphase nuclei of human and gorilla and white hand gibbon. Mol Cytogenet 1: 9.

Manvelyan M, Hunstig F, Bhatt S, Mrasek K, Pellestor F, Weise A, Simonyan I, Aroutiounian R, Liehr T. 2008b. Chromosome distribution in human sperm - a 3D multicolor banding-study. Mol Cytogenet 1: 25.

Manvelyan M, Kempf P, Weise A, Mrasek K, Heller A, Lier A, Höffken K, Fricke HJ, Sayer HG, Liehr T, Mkrtchyan H. 2009. Preferred co-localization of chromosome 8 and 21 in myeloid bone marrow cells detected by three dimensional molecular cytogenetics. Int J Mol Med 24(3): 335-41.

Mark J. 1973. Karyotype patterns in human meningiomas. A comparison between studies with G- and Q-banding techniques. Hereditas 75(2): 213-9.

Mendel G. 1866. Versuche über Pflanzen-Hybriden. Verhandlungen des Naturforschenden Vereins zu Brünn 4: 3-47.

Morgagni GB. 1761. De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis. Bologna.

Mudrak O, Tomilin N, Zalensky A. 2005. Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. J Cell Sci 118(Pt 19): 4541-50.

Müller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J. 1998. Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. Cytometry 33(4): 445-52.

Müller S, Wienberg J. 2006. Multicolor chromosome bar codes. Cytogenet Genome Res 114(3-4): 245-9.

Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK. 1989. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. Cytometry 10(1): 20-7.

- Pardue ML, Gall JG. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc Natl Acad Sci U S A 64(2): 600-4.
- Payer B, Lee JT. 2008. X Chromosome Dosage Compensation: How Mammals Keep the Balance. Annual Review of Genetics 42: 733-772
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A 83(9): 2934-8.
- Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y. 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. Science 300(5616): 131-5.
- Rabl C. 1885. Ueber Zelltheilung. Morphologisches Jahrbuch 10: 214-330
- Reichle C, Sparbier K, Müller T, Schnelle T, Walden P, Fuhr G. 2001. Combined laser tweezers and dielectric field cage for the analysis of receptor-ligand interactions on single cells. Electrophoresis 22(2): 272-82.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 113(1): 237-51.
- Rubtsov N, Senger G, Kuzcera H, Neumann A, Kelbova C, Junker K, Beensen V, Claussen U. 1996. Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification, and reverse painting. Hum Genet 97(6): 705-9.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239(4839): 487-91.
- Schardin M, Cremer T, Hager HD, Lang M. 1985. Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. Hum Genet 71(4): 281-7.
- Scherthan H, Eils R, Trelles-Sticken E, Dietzel S, Cremer T, Walt H, Jauch A. 1998. Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. J Cell Sci 111 ( Pt 16): 2337-51.
- Schleiden MJ. 1838. Beiträge zur Phytogenesis.
- Schreck RR, Distèche CM. 2001. Chromosome banding techniques. Curr Protoc Hum Genet Chapter 4: Unit 4.2.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science 273(5274): 494-7.

- Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2(7731): 971-2.
- Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, Hrsg. 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger Verlag
- Solov'eva L, Svetlova M, Bodinski D, Zalensky AO. 2004. Nature of telomere dimers and chromosome looping in human spermatozoa. Chromosome Res 12(8): 817-23.
- Solovei I, Schermelleh L, Düring K, Engelhardt A, Stein S, Cremer C, Cremer T. 2004. Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. Chromosoma 112(8): 410-23.
- Solovei I, Walter J, Cremer M., Habermann F, Schermelleh L, Cremer T. 2002. FISH on three-dimensionally preserved nuclei. In: Beatty B, Mai S, Squire J, Hrsg. FISH, A Practical Approach, Oxford: University Press, 119-157
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet 12(4): 368-75.
- Steinhaeuser U, Starke H, Nietzel A, Lindenau J, Ullmann P, Claussen U, Liehr T. 2002. Suspension (S)-FISH, a new technique for interphase nuclei. J Histochem Cytochem 50(12): 1697-8.
- Steinhäuser U. 2007. Fluoreszenz in situ Hybridisierung an dreidimensional erhaltenen Interphasekernen. [Dissertation] Jena, Friedrich-Schiller-Universität
- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res 75(1): 304-6.
- Sun HB, Shen J, Yokota H. 2000. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. Biophys J 79(1): 184-90.
- Sutton WS. 1904. The chromosomes inheritance. Biol Bul. 4: 231-248.
- Tanabe H, Küpper K, Ishida T, Neusser M, Mizusawa H. 2005. Inter- and intra-specific gene-density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. Cytogenet Genome Res 108(1-3): 255-61.
- Tijo JH, Levan A. 1956. The chromosomal number of man. Hereditas 42: 1-6.
- Verma RS, Babu A. 1994. Human chromosomes: Principles and techniques. 2nd ed. of McGraw-Hill, Inc.
- Viegas-Péquignot E, Derbin C, Malfoy B, Taillandier E, Leng M, Dutrillaux B. 1983. Z-DNA immunoreactivity in fixed metaphase chromosomes of primates. Proc Natl Acad Sci U S A 80(19): 5890-4.
- Virchow R. 1871. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin: Verlag von August Hirschwald

- Visser AE, Aten JA. 1999. Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei. J Cell Sci 112 ( Pt 19): 3353-60.
- Vourc'h C, Taruscio D, Boyle AL, Ward DC. 1993. Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes. Exp Cell Res 205(1): 142-51.
- Waldeyer W. 1888. Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. Arch Mikrosk Anat 32: 1-22
- Warburton D, Naylor AF, Warburton FE. 1973. Spatial relations of human chromosomes identified by quinacrine fluorescence at metaphase. I. Mean interchromosomal distances and distances from the cell center. Humangenetik 18(4): 297-306.
- Watson JD, Crick FH. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171(4356): 737-8.
- Weierich C, Brero A, Stein S, von Hase J, Cremer C, Cremer T, Solovei I. 2003. Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. Chromosome Res 11(5): 485-502.
- Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T. 2003. Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. Cytogenet Genome Res 103(1-2): 34-9.
- Weise A, Liehr T, Claussen U, Halbhuber KJ. 2005. Increased efficiency of fluorescence in situ hybridization (FISH) using the microwave. J Histochem Cytochem 53(10): 1301-3.
- Wollenberg C, Kiefaber MP, Zang KD. 1982. Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. IX. Arrangement of chromosomes with and without spindle apparatus. Hum Genet 62(4): 310-5.
- Yurov YB, Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY. 2001. Molecular-cytogenetic investigation of skewed chromosome X inactivation in Rett syndrome. Brain Dev 23 Suppl 1: S214-7.
- Zorn C, Cremer C, Cremer T, Zimmer J. 1979. Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. Exp Cell Res 124(1): 111-9.
- Zorn C, Cremer T, Cremer C, Zimmer J. 1976. Laser UV microirradiation of interphase nuclei and post-treatment with caffeine. A new approach to establish the arrangement of interphase chromosomes. Hum Genet 35(1): 83-9.

## 6. Anhang:

Länge zentr	Breite zentr	Länge periph	Breite periph	MPAbst.zen	MPAbst.per	lä*brei zentr	lä*brei peri
2,58	4,31	2,82	3,83	2,89070926	3,71164384	11,1198	10,8006
2,16	2,3	4,76	2,5	1,9356136	3,01029899	4,968	11,9
4,9	1,87	3,29	3,18	2,54017716	3,17795532	9,163	10,4622
5,24	2,56	2,88	2,25	3,07442678	3,96416448	13,4144	6,48
1,58	1,51	1,71	1,71	1,81936802	2,46679955	2,3858	2,9241
2,78	1,85	2,06	2,21	1,70777633	2,52820094	5,143	4,5526
2,14	2,07	1,97	2,04	2,94803324	4,25523207	4,4298	4,0188
3,26	2,24	2,59	1,62	3,63792523	3,88396704	7,3024	4,1958
2,46	2,69	3,37	2,07	1,88387898	3,61919881	6,6174	6,9759
3,81	1,45	2,79	2,12	1,9864793	2,92049653	5,5245	5,9148
2,68	2,27	3,01	1,89	2,69868486	3,63608306	6,0836	5,6889
5,3	1,72	2,9	3,45	3,28764353	3,92833298	9,116	10,005
2,8	3,29	2,94	3,5	3,98509724	7,96488544	9,212	10,29
3,16	2,4	3,66	2,34	2,83869688	3,24266865	7,584	8,5644
3,96	1,86	4,79	1,78	3,030594	3,36431271	7,3656	8,5262
3,32	1,89	2,23	1,74	2,87294274	5,82795848	6,2748	3,8802
4,28	1,59	4,12	1,39	2,80517379	4,22473668	6,8052	5,7268
5,75	1,5	3,82	3,22	3,00074991	3,25129205	8,625	12,3004
3,21	0,85	2,82	1,03	1,1812705	2,7349223	2,7285	2,9046
4,31	4,08	3,42	2,03	2,44591496	3,88032215	17,5848	6,9426
2,34	2,33	2,64	1,93	2,24557342	3,61597843	5,4522	5,0952
2,39	2,66	2,67	2,7	2,72536236	2,85050873	6,3574	7,209
4,54	2,58	4,25	2,29	2,035043	4,22125574	11,7132	9,7325
1,95	4,02	3,35	2,13	1,81333946	2,18622963	7,839	7,1355
6,08	2,2	4,65	2,41	3,43010204	3,47880727	13,376	11,2065
5,2	2,79	4,08	1,8	1,75872113	3,99152853	14,508	7,344
3	1,97	3,78	2,42	1,91734191	2,24401426	5,91	9,1476
2,24	2,36	3,8	2,28	2,84987719	3,45163729	5,2864	8,664
3,62	1,69	4,78	1,71	3,42562403	3,66252645	6,1178	8,1738
3,85	1,91	4,61	2,79	1,60043744	2,16732554	7,3535	12,8619

Tab. 6.1 Rohdaten (reine Messwerte) in  $\mu\text{m}$  zu den Ergebnissen unter 3.2.2; zen, zentr = zentral; per, periph = peripher; MPAbst. = Abstand zum Mittelpunkt; lä = Länge; brei = Breite

Binak	Linak	Bak	Lak	Abstand inak	Abstand ak	Binak*Linak	Bak*Lak
0,7	1,53	1,17	1,89	2,43380361	4,040569267	1,071	2,2113
0,76	0,52	0,93	0,63	2,50726943	3,025822202	0,3952	0,5859
1,29	3,35	1,98	0,99	4,1000122	1	4,3215	1,9602
0,88	0,36	0,83	0,83	2,90580436	2,237163383	0,3168	0,6889
0,58	0,52	1,23	1,2	4,70316914	3,573709557	0,3016	1,476
3,66	0,51	1,16	2,79	3,42165165	2,601557226	1,8666	3,2364
0,94	0,46	1,02	2,26	4,39683977	3,105913714	0,4324	2,3052
0,8	1,64	1,9	1,34	2,80862956	2,239776775	1,312	2,546
1,11	1,22	1,54	0,57	3,89667807	3,017034968	1,3542	0,8778
2,28	1,16	1,01	2,24	5,58025985	4,846782438	2,6448	2,2624

Tab. 6.2 Rohdaten (reine Messwerte) in  $\mu\text{m}$  zu den Ergebnissen unter 3.2.3; inak = inaktiv; ak = aktiv; B = Breite; L = Länge

**Häufigkeiten**

	N
Breite periph - Breite zentr	
Negative Differenzen(a)	12
Positive Differenzen(b)	11
Bindungen(c)	0
Gesamt	23

a Breite periph &lt; Breite zentr

b Breite periph &gt; Breite zentr

c Breite periph = Breite zentr

**Statistik für Test(b)**

	Breite periph - Breite zentr
Exakte Signifikanz (2-seitig)	1,000(a)

a Verwendete Binomialverteilung.

b Vorzeichentest

**Häufigkeiten**

	N
Länge periph - Länge zentr	
Negative Differenzen(a)	13
Positive Differenzen(b)	10
Bindungen(c)	0
Gesamt	23

a Länge periph &lt; Länge zentr

b Länge periph &gt; Länge zentr

c Länge periph = Länge zentr

**Statistik für Test(b)**

	Länge periph - Länge zentr
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,678(a)

a Verwendete Binomialverteilung.

b Vorzeichentest



**Häufigkeiten**

	N
lä*brei peri - lä*brei zentr	
Negative Differenzen(a)	12
Positive Differenzen(b)	11
Bindungen(c)	0
Gesamt	23

a lä\*brei peri &lt; lä\*brei zentr

b lä\*brei peri &gt; lä\*brei zentr

c lä\*brei peri = lä\*brei zentr

**Statistik für Test(b)**

	lä*brei peri - lä*brei zentr
Exakte Signifikanz (2-seitig)	1,000(a)

a Verwendete Binomialverteilung.

b Vorzeichentest

Abb. 6.1a) zen, zentr = zentral; per, per; periph = peripher; MPAbst . = Abstand zum Mittelpunkt; lä = Länge; brei = Breite

**Häufigkeiten**

	N
Bak*Lak - Binak*Linak	
Negative Differenzen <sup>a</sup>	3
Positive Differenzen <sup>b</sup>	5
Bindungen <sup>c</sup>	0
Gesamt	8

a. Bak\*Lak &lt; Binak\*Linak

b. Bak\*Lak &gt; Binak\*Linak

c. Bak\*Lak = Binak\*Linak

**Statistik für Test<sup>b</sup>**

	Bak - Binak
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,289 <sup>a</sup>

a. Verwendete Binomialverteilung.

b. Vorzeichentest

**BB**  
**B**

**Häufigkeiten**

	N
Lak - Linak Negative Differenzen <sup>a</sup>	3
Positive Differenzen <sup>b</sup>	7
Bindungen <sup>c</sup>	0
Gesamt	10

a. Lak &lt; Linak

b. Lak &gt; Linak

c. Lak = Linak

**Statistik für Test<sup>b</sup>**

	Lak - Linak
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,344 <sup>a</sup>

a. Verwendete Binomialverteilung.

b. Vorzeichentest

**Häufigkeiten**

	N
Bak*Lak - Binak*Linak Negative Differenzen <sup>a</sup>	3
Positive Differenzen <sup>b</sup>	5
Bindungen <sup>c</sup>	0
Gesamt	8

a. Bak\*Lak &lt; Binak\*Linak

b. Bak\*Lak &gt; Binak\*Linak

c. Bak\*Lak = Binak\*Linak

**Statistik für Test<sup>b</sup>**

	Bak*Lak - Binak*Linak
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,727 <sup>a</sup>

a. Verwendete Binomialverteilung.

b. Vorzeichentest

**Häufigkeiten**

	N
Abstand ak - Abstand inak Negative Differenzen <sup>a</sup>	8
Positive Differenzen <sup>b</sup>	2
Bindungen <sup>c</sup>	0
Gesamt	10

a. Abstand ak &lt; Abstand inak

b. Abstand ak &gt; Abstand inak

c. Abstand ak = Abstand inak

### Statistik für Test<sup>b</sup>

	Abstand ak - Abstand inak
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,109 <sup>a</sup>

a. Verwendete Binomialverteilung.

b. Vorzeichentest

Abb. 6.1b) inak = inaktiv; ak = aktiv; B = Breite; L = Länge

Abb. 6.1 Auszüge aus dem Statistikprogramm SPSS bei angewendetem Vorzeichentest a) zu den Ergebnissen für Länge, Breite und Länge\*Breite der peripheren und zentralen Chromosomen aus 3.2.2 und b) zu Länge, Breite, Länge\*Breite und Abstand der aktiven und inaktiven Chromosomen aus 3.2.3

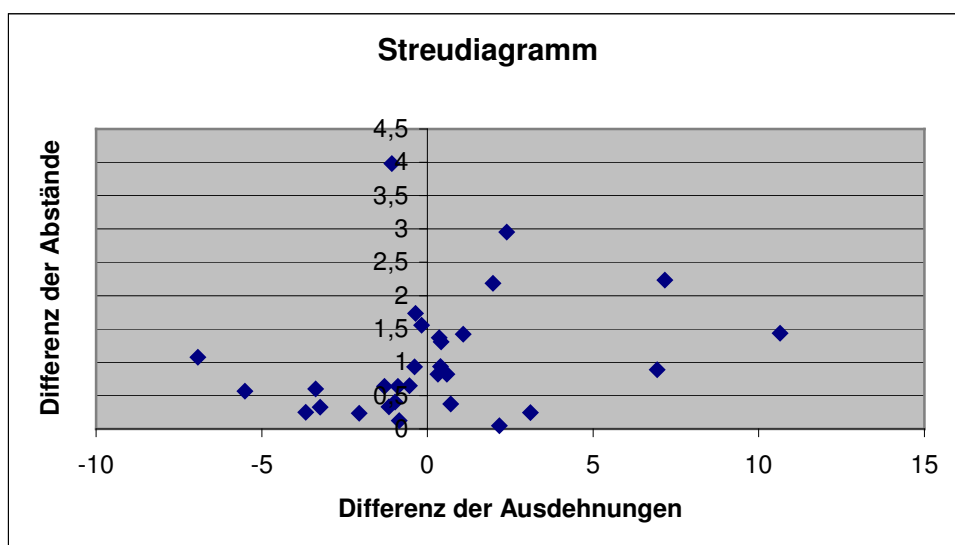


Abb. 6.2 a) Graphische Darstellung der jeweiligen Differenzen der Abstände der Chromosomen zum Mittelpunkt und deren Größenausdehnungen für die Kerne aus 3.2.2 in  $\mu\text{m}$

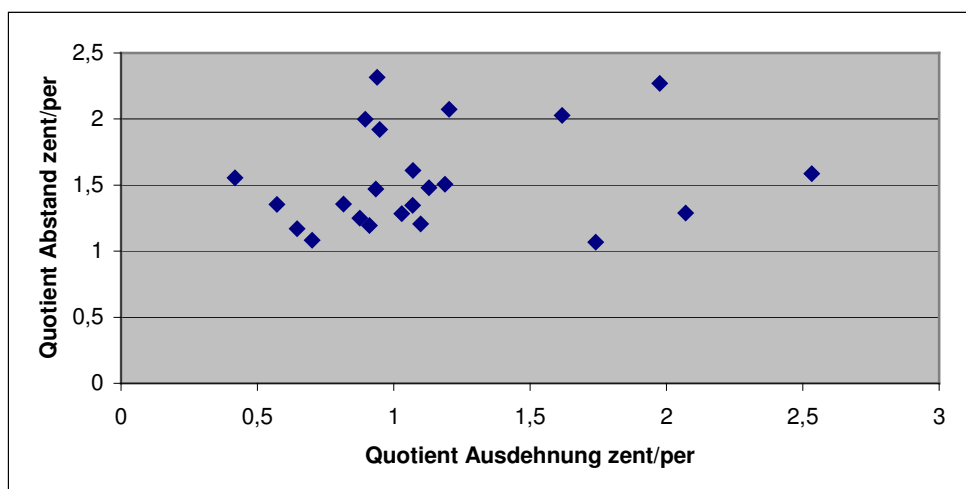
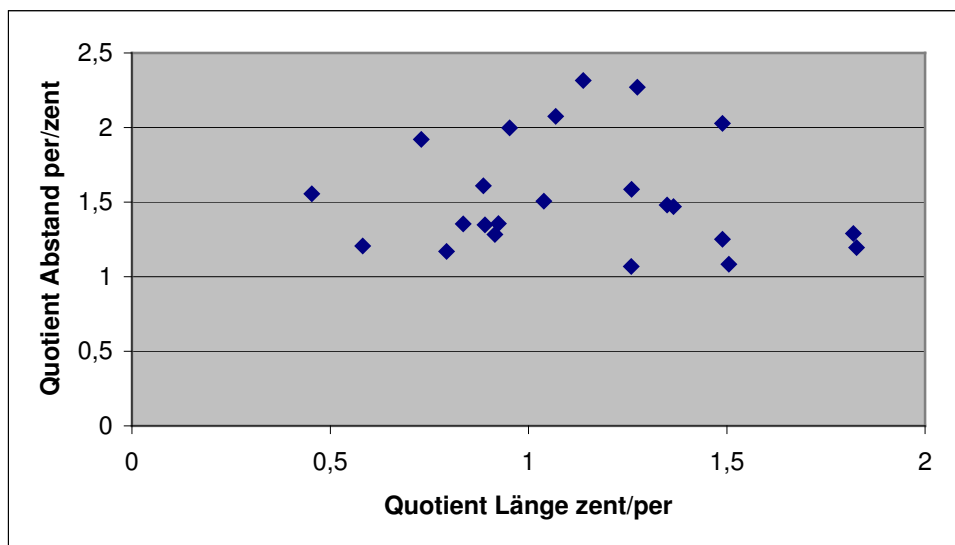
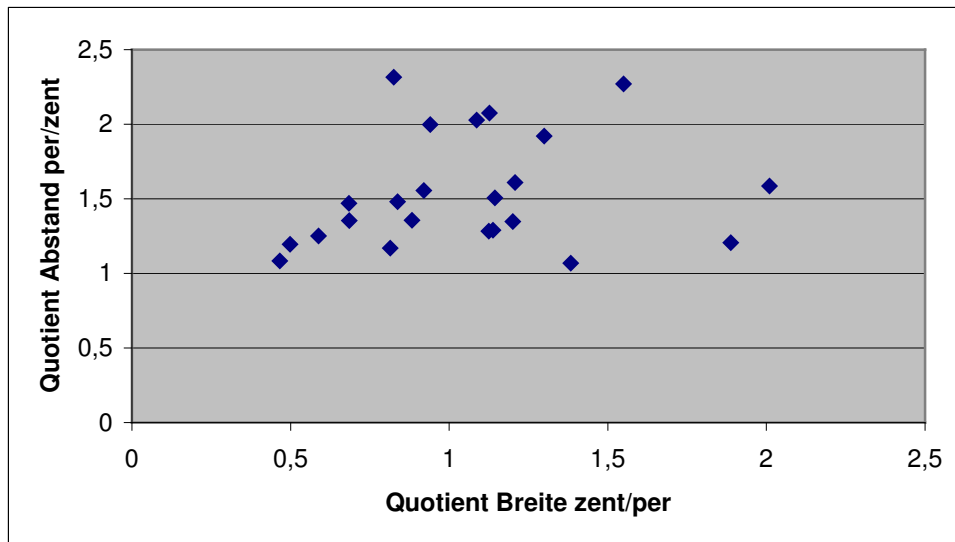


Abb. 6.2 b) Graphische Darstellung nach Quotientenbildung der Abstände der Chromosomen zum Mittelpunkt und deren Breiten, Längen und Ausdehnungen für die Kerne aus 3.2.2; zent. = zentral; per = peripher

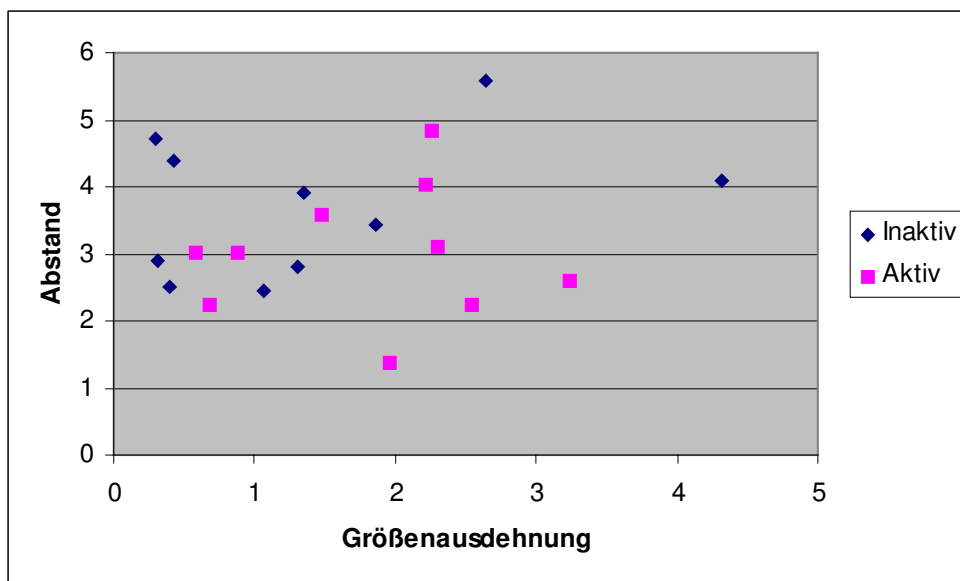


Abb. 6.3.a) Graphische Darstellung von Abstand und Größenausdehnung der aktiven und inaktiven Chromosomen aus 3.2.3 in  $\mu\text{m}$

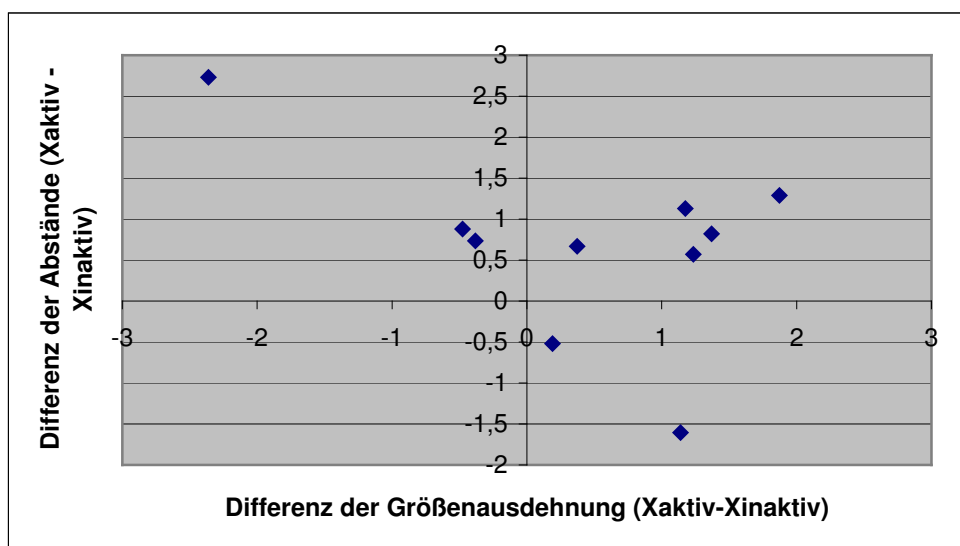


Abb. 6.3.b) Graphische Darstellung zum Abstands- und Größenvergleich mittels Differenzbildung aus aktivem und inaktivem Chromosomen aus 3.2.3 in  $\mu\text{m}$

## Danksagungen

Diese Arbeit wurde hauptsächlich am Institut für Humangenetik und Anthropologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Arbeitsgruppe „Molekulare Zytogenetik“ von Herrn PD Dr. rer.nat./ med.habil. Thomas Liehr durchgeführt.

Für diese exzellente Betreuung möchte ich mich zuerst bei Herrn PD Dr. Thomas Liehr bedanken. Sein Engagement bei der Organisation der Rahmenbedingungen und Weiterbildungsmöglichkeiten, seine ausführliche Beratung zu allen Fragen und auch die Freiräume, die mir bei der Lösung der Probleme gelassen wurden, waren die wesentliche Grundlage für das Entstehen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Direktor des Instituts Herrn Prof. Dr. Aria Baniahmad und dessen Vorgänger, Herrn Prof. Dr. Uwe Claussen, der in der Anfangsphase dieser Arbeit beratend zur Seite stand.

Ferner danke ich den früheren und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Zytogenetik“. Neben wertvollen Hilfestellungen in allen fachlichen Fragen waren sie auch stets hervorragende Kolleginnen und Kollegen, in deren Kreis ich mich bestens aufgenommen fühlen konnte. Spezieller Dank für die besondere fachliche Unterstützung sei hierbei an Frau Monika Ziegler und Herrn Dr. Ulf Steinhäuser, der das S-FISH-Verfahren maßgeblich entwickelt hat, gerichtet. Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Marina Manvelyan und Herrn Dr. Samarth Bhatt für die ausgezeichnete Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Spermienanalytik sowie Herrn Dr. Ivan Iourov bei der Hirnpräparation.

Für die Hilfe bei der Zellpräparation und der Präparation der XIST-Sonde danke ich den Arbeitsgruppen „Zytogenetik“ von Frau Dr. Anja Weise, „Tumorgenetik“ von früher Herrn Dr. Ivan Loncarevic und „Molekulargenetik“ von Herrn Prof. Dr. Aria Baniahmad.

Für die Bereitstellung des Plasmids für die XIST-Sonde danke ich Frau Prof. Dr. Carolyn Brown von der University of British Columbia in Vancouver, Kanada.

Ein Dank gilt der Firma ZEISS Jena für die Kooperation bei der Bildgebung sowie dem Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation Jena für die Beratung.

Dem IZKF Jena möchte ich danken für das sechsmonatige Promotionsstipendium.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meine Familie, speziell meine Mutter Frau Dr. Brigitte Hunstig-Inkmann. Durch ihr Vorbild und ihre bedingungslose Unterstützung und Ermutigung – auch aus den schwierigsten familiären Situationen heraus – konnte diese Arbeit möglich gemacht werden.

Ich danke weiterhin allen Freunden und Kommilitonen, die mich im Verlauf der Arbeit begleitet haben.

## Lebenslauf

Name: Hunstig, Friederike Theresia Maria  
 Geburtsdatum: 03.04.1983  
 Geburtsort: Salzkotten, Kreis Paderborn

Schul Ausbildung:  
 1993 –2002: Pelizaeus Gymnasium Paderborn  
 2002: Abitur

Studium:  
 10/2002 – jetzt: Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität  
 Jena und der Universität Oulu in Finnland  
 09/2004: Ärztliche Vorprüfung  
 12/2009: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
  
 seit 2006: Promotionsarbeit am Institut für Humangenetik und  
 Anthropologie der FSU Jena bei Herrn PD Dr. Thomas Liehr,  
 gefördert durch ein Promotionsstipendium des IZKF Jena

Jena im Januar 2010

## Publikationen:

Bhatt, S., K. Moradkhani, Mrasek K, Puechberty J, Manvelyan M, **Hunstig F**, Lefort G, Weise A, Lespinasse J, Sarda P, Liehr T, Hamamah S, Pellestor F. (2009). "Breakpoint mapping and complete analysis of meiotic segregation patterns in three men heterozygous for paracentric inversions." Eur J Hum Genet 17(1): 44-50.

Liehr, T., H. Starke, H., Heller A., Kosyakova N., Mrasek K., Gross M., Karst C., Steinhäuser U., **Hunstig F.**, Fickelscher I., Kuechler A., Trifonov V., Romanenko S.A., Weise A. (2006). "Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding." Cytogenet Genome Res 114(3-4): 240-4.

Manvelyan, M., **F. Hunstig**, Bhatt S, Mrasek K, Pellestor F, Weise A, Simonyan I, Aroutiounian R, Liehr T. (2008). "Chromosome distribution in human sperm - a 3D multicolor banding-study." Mol Cytogenet 1: 25.

Manvelyan, M., **F. Hunstig**, Mrasek K, Bhatt S, Pellestor F, Weise A, Liehr T. (2008). "Position of chromosomes 18, 19, 21 and 22 in 3D-preserved interphase nuclei of human and gorilla and white hand gibbon." Mol Cytogenet 1(1): 9.

## Buchbeitrag:

**Friederike Hunstig**, Marina Manvelyan, Samarth Bhatt, Ulf Steinhäuser and Thomas Liehr. Three Dimensional Interphase Analysis Enabled by Suspension-FISH. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) – Application Guide*. T. Liehr (ed.) ©Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009 Chapter 12, Page 313-320

## Wissenschaftlicher Vortrag

Zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Bonn 2007:

**Hunstig F.**, Manvelyan M., Pellestor F., Bhatt S., Aroutiounian R., Liehr T. (2007). 3-D multicolor banding reveals the orientation of chromosomes in human sperm – a pilot study. *Med Genetik* 19, p 57 (Abstractnr. W8 04)

## Abstracts:

**Hunstig F.**, Manvelyan M., Pellestor F., Bhatt S., Aroutiounian R., Liehr T. (2007). 3-D multicolor banding reveals the orientation of chromosomes in human sperm – a pilot study. *Med Genetik* 19, p 57 (Abstractnr. W8 04)

**Hunstig F.**, Pellestor F., Steinhäuser U., Starke H., Ziegler M., Claussen U., Liehr T. (2006). Multicolor banding studies on the 'Barr-body' in 3D-preserved human lymphocytes and on chromosomal orientation in human sperm interphase nuclei. *Med Genetik* 18, p 83 (Abstractnr. P161)



**Hunstig F.**, Pellestor F., Steinhäuser U., Starke H., Ziegler M., Claussen U., Liehr T. (2006). Multicolor banding studies on the 'Barr-body' in 3D-presevered human lymphocytes and on chromosomal orientation in human sperm interphase nuclei. *Abstractbook of the 2nd conference on X-inactivation*, p72.

T Liehr, **F Hunstig**, S Bhatt, F Pellestor, K Mrasek, A Weise, I Simonyan, R Aroutiounian, M Manvelyan. The 3-dimensional distribution of human chromosomes in sperm. Abstracts des 59th annual meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, Hawaii, USA, 20-24, Abstractnummer 1661T

M Manvelyan, **F Hunstig**, S Bhatt, F Pellestor, K Mrasek, A Weise, I Simonyan, R Aroutiounian, T Liehr. The 3-dimensional distribution of human chromosomes in sperm. Abstracts zum 8. Russischen Kongress Moderne Methoden in der Pädiatrie und Kinderchirurgie. Moskau, 20-22- Oktober, 2009, p106.

M Manvelyan, **F Hunstig**, f Pellestor, S Bhatt, R Aroutiounian, T Liehr. 3-D multicolor banding reveals the orientation of chromosomes in human sperm – a pilot study. Abstractbook of the 2nd international medical congress of Armenia. 28.-30.06.2007, Yerevan, Armenia, p22.

P Kempf, H Mkrtchyan, M Manvelyan, A Lier, A Heller, K Mrasek, **F Hunstig**, A Weise, T Liehr. 3D-interphase FISH studies of chromosomes 8 and 21 in AML patients with trisomy 8. Abstracts zum 8. Russischen Kongress Moderne Methoden in der Pädiatrie und Kinderchirurgie. Moskau, 20-22- Oktober, 2009, p105.

P Kempf, H Mkrtchyan, M Manvelyan, A Lier, A Heller, K Mrasek, **F Hunstig**, A Weise, T Liehr. 3D-interphase studies of chromosomes 8 and 21 in AML patients with trisomy 8. Abstracts zum Postgraduate-Symposium on Cancer Research, Dornburg May 9th 2009, p1-2 (Abstractnummer A3).

T Liehr, **F Hunstig**, S Bhatt, F Pellestor, K Mrasek, A Weise, I Simonyan, R Aroutiounian, M Manvelyan. 3-dimensional multicolor banding (3D-MCB) reveals the distribution of chromosomes in human sperm. *MedGen 2009*, Vol 21, p 76 (Abstractnr. W8 04).

H Mkrtchyan, M Manvelyan, P Kempf, A Lier, A Heller, K Mrasek, **F Hunstig**, A Weise, T Liehr. 3D-interphase studies of chromosomes 8 and 21 in AML patients with trisomy 8. *MedGen 2009*, Vol 21, p 110 (Abstractnr. P112).

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr PD Dr. Thomas Liehr

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, .....

Friederike Hunstig